

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
EDNEIA AMANCIO DE SOUZA RAMOS CAVALIERI

**PERFIL EPIGENÉTICO DOS GENES *CXCR4*, *CXCL12*, *ESR1*, *PGR* E
MMP2 ENVOLVIDOS COM O MECANISMO MOLECULAR DE
METÁSTASE EM CÂNCER DE MAMA**

CURITIBA
2013

EDNEIA AMANCIO DE SOUZA RAMOS CAVALIERI

**PERFIL EPIGENÉTICO DOS GENES *CXCR4*, *CXCL12*, *ESR1*, *PGR* E
MMP2 ENVOLVIDOS COM O MECANISMO MOLECULAR DE
METÁSTASE EM CÂNCER DE MAMA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Microbiologia, Parasitologia e Patologia da
Universidade Federal do Paraná, como requisito
parcial para obtenção do grau de doutor em
Ciências Biológicas.

Profª Drª Giseli Klassen

**CURITIBA
2013**

Universidade Federal do Paraná
Sistema de Bibliotecas

Cavaliere, Edneia Amancio de Souza Ramos
Perfil epigenético dos genes *CXCR4*, *CXCL12*, *ESR1*, *PGR* e *MMP2*
envolvidos com o mecanismo molecular de metástase em câncer de
mama. / Edneia Amancio de Souza Ramos Cavaliere. – Curitiba, 2013.
118 f.: il. ; 30cm.

Orientador: Giseli Klassen

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e
Patologia.

1. Mamas - Cancer 2. Metastase I. Título II. Klassen, Giseli. III.
Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa
de Pós-Graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

CDD (20. ed.) 616.99249



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
Departamento de Patologia Básica
Pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia.

TERMO DE APROVAÇÃO

**“PERFIL EPIGENÉTICO DOS GENES *CXCR4*, *CXCL12*, *ESR1*, *PGR*
E MMP2 ENVOLVIDOS COM O MECANISMO MOLECULAR DE
METÁSTASE EM CÂNCER DE MAMA”**

Por

EDNEIA AMANCIO DE SOUZA RAMOS CAVALIERI

**Tese aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de
Doutor no Curso de Pós-Graduação em Microbiologia,
Parasitologia e Patologia, pela Comissão formada pelos
professores:**

Prof^a. Dr^a. Giseli Klassen (presidente)

Prof^a. Dr^a. Karin Braun Prado

Prof. Dr. Emanuel Maltempi de Souza

Prof^a. Dr^a. Fabiane G. M. Rego

Prof. Dr. Raphael Bessa Parmigiani

Curitiba, 26 de julho de 2013.

DEDICATÓRIA

Esta tese destina-se à milhares de mulheres que lutaram ou ainda lutam contra o câncer de mama. Às mulheres que (infelizmente) contribuíram para as análises de sobrevida. “Meus p (s)” significativos não valeram as suas vidas!

Que daqui a alguns anos só existam teses mostrando como as pesquisas de hoje ajudaram com a melhora da perspectiva e da qualidade de vida das pessoas com câncer.

Esta tese merece também uma dedicatória especial a três grandes mulheres: à minha mãe (Neusete) pela sua força e por suas conquistas durante toda a sua vida, e pela ajuda durante todos estes anos de vida! À minha mãe postiça (Jussara) que além de ter dado à vida ao meu amado esposo, cuidou durante horas do Antonio Augusto me dando a oportunidade de finalizar meus estudos, liberando minhas mãos e meus pensamentos, e de quebra enchendo meu estômago! E à minha mãe científica (Giseli): que me acolheu e me adotou durante todos estes anos. Que brigou comigo e me animou, que trocou os meus projetos, me deu pilhas de artigos de presente (e não precisava nem ser em datas comemorativas!) e garantiu as férias no laboratório durante todos estes anos! Muito obrigada por tudo!

E por fim, ao meu amado esposo Marco Antonio pela ajuda, pela insistência e pela paciência! E também pela falta dela! Aos meus amados filhos pela presença e cuidado!

AGRADECIMENTOS

São muitos os agradecimentos que cabem à esta tese. Afinal, são muitos anos em que várias pessoas passaram pelo meu caminho e ajudaram a sua maneira. Minha trajetória no laboratório foi semelhante a de muitos. Afinal, na área biológica os alunos que ali permanecem sempre rondam os mesmos professores. Eu iniciei minha vida acadêmica no laboratório de Epigenética recém criado em 2006, que já foi chamado de laboratório de biologia molecular, e até já foi sem nome! Dentre as mudanças, e digo mudanças de andar, físicas, incontáveis caixas que eu transporte e semanas de limpeza ante e posteriori ao laboro, são quase 8 anos de convivência. Vi muitos alunos passarem por aqui. Alguns deixaram as suas marcas e outros, nem tanto. Foi um ano de iniciação científica, dois anos de mestrado e quatro anos e meio de doutorado. O mestrado foi uma época complicada, sem bolsa e tendo que trabalhar. Trabalhar de noite, durante o horário que deveria estar dormindo. Peguei tempo de vacas magras: faltando desde reagente até a equipamentos. Mas também pude presenciar momentos em que detínhamos tudo o que precisávamos. E fizemos muito!! E se tivéssemos dinheiro então!! Já o doutorado, primeira turma: faço, ou não faço? Com certeza, teve um dedo, e até uma mão inteira, quase um empurrão eu diria de minha orientadora e de meu marido, na época namorado. E parece que as coisas vão se ajeitando devagarinho. Com bolsa ficou mais tranquilo, pelo menos eu podia dormir de noite agora! Problemas com projeto? É só fazer mais de um que daí não tem problema não dar certo!! Não é possível que nenhum funcione! Mas em compensação, agora temos três artigos aqui! Todos estes anos merecem agradecimentos à todos que estão descritos aqui neste pequeno pedaço de papel.

Acima de tudo, agradeço à minha orientadora Giseli Klassen pela aceitação, pelo aprendizado e carinho. Todas as pessoas acham que seus orientadores são malucos (inclusive eu!), mas tenho pra mim que o nome dessa loucura é “paixão”. Paixão pelo que faz e pelo que se quer fazer. Paixão pela descoberta e pela auto afirmação. Quem não quer ser reconhecido pelo que faz! Lembro das vezes em que batia a vontade de desistir, mas sempre tinha um “q” de ia dar certo. Ou a necessidade de que desse certo! Aprendi não só a entender a essa paixão, como também compartilhá-la. Por tudo que você fez e ainda faz por mim: muito obrigada.

Agradeço às minhas amigas(os) do começo, meio e fim: Gerusa e Mariana G., Simone, Cristiane, Renata, Fernando, Camila, Isabela, Andressa, Mariana B., Ana Carolina, Liliane e Graciele.

Impossível citar a todos os alunos que passaram pela minha vida durante estes anos, mas deixo meu agradecimento aos seus tutores. À todos os alunos dos laboratórios dos professores Silvio Zanata, Adriana Mercadante e Lia Sumie. Também preciso agradecer aos alunos dos professores Edilene, Iglénir e Enilze. Sem contar, é claro aos alunos do Profº Emanuel. Às incontáveis seções de “por favor” e “obrigada” para cada necessidade durante este período.

Pelo Instituto de Pesquisa sobre o Câncer sob responsabilidade da Dra Anamaria Camargo. Pelas linhagens cedidas, pela infraestrutura e pela colaboração. Aos pesquisadores Raphael Parmigiani (e suas alunas) e ao Erico Costa pelo auxílio.

Ao Valter Baura pelas conversas, piadas e músicas. Pelas reações de sequenciamento, que não foram poucas, e pela ajuda no que se fizesse necessário. A D. Roseli pelos incontáveis auxílios durante todos estes anos.

Pelos alunos do departamento de Bioquímica. A todos que passaram algum dia pela salas 275 e 272. À profª Fabiane pela disponibilidade de sempre.

À Profª Karin pela ajuda de sempre e pelo seu alto astral!

Ao curso de pós-graduação em Microbiologia, Parasitologia e Patologia pela aceitação e pela vaga. Pela bolsa e pelo currículo. Aos professores, pelas aulas e pelo carinho.

Preciso fazer um agradecimento especial à Graciele. Pelos dias de companheirismo, pelos almoços, pela ajuda com as células, com os cultivos, com o projeto. Pelas palavras de carinho e pela amizade.

Aos meus familiares pelo aconchego e com a pergunta célebre: “mas você ainda não parou de estudar? Quando é que você vai trabalhar?”

A minha velha família: irmãos, cunhadas, sobrinhos (as) e minha à querida irmã e também à minha nova família: meu sogro, sogra e cunhada pela aceitação e apoio.

À minha família, sobretudo, aos meus meninos e ao meu marido. Sua insistência e suporte foram indispensáveis nestes anos.

Pedras no caminho?
Guardo todas, um dia vou construir um castelo...
(Fernando Pessoa)

RESUMO

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres. Estima-se que 90% das causas de mortes são devido às metástases. Importantes moléculas estão envolvidas no processo metastático: as quimiocinas são moléculas envolvidas na sinalização e direcionamento dos sítios de metástases e os genes de receptores hormonais estão envolvidos na proliferação das células, enquanto proteases presentes no microambiente tumoral auxiliam na degradação dos constituintes da matriz. Os mecanismos epigenéticos, tais como metilação do DNA e a modificação das histonas estão envolvidos na regulação da expressão de vários genes envolvidos nas várias etapas deste processo. Sendo assim, os genes *CXCR4*, *CXCL12*, *ESR1* e *PGR* foram avaliados por análise da metilação do DNA na região promotora e pela presença da proteína por imunohistoquímica em tumores primários de mama e adicionalmente, o gene *MMP2* também foi avaliado por imunoprecipitação de cromatina em linhagem tumoral de mama sendo ao dados subdivididos em três artigos científicos. Os dados de metilação do DNA da região promotora de *CXCR4* mostrou que 67% dos tumores primários de mama apresentaram a região analisada desmetilada, sendo esta característica associada ao estágio tumoral, tamanho, grau histológico, acometimento de linfonodos, metástase e morte das pacientes. Por outro lado, a hipermetilação do DNA da região promotora dos genes *CXCL12* e *ESR1* também apresentou significância. Análises estatísticas de sobrevida mostraram que o sincronismo entre a metilação de *CXCL12* e a não metilação de *CXCR4* é uma importante característica na sobrevida global e livre de doença, e contribui para pior prognóstico às pacientes. Os resultados de metilação específica por PCR (MSP) da região promotora destes genes poderiam auxiliar na avaliação da progressão de tumores de mama. Na prática clínica, a presença das proteínas do receptor de estrógeno (RE) e progesterona (RP) por imunohistoquímica contribui para um melhor prognóstico às pacientes e a ausência da expressão dos produtos destes dois genes se dá, em parte, pela hipermetilação do DNA na região promotora em carcinomas mamários. Cerca de 80% das pacientes com metástase e/ou morte apresentaram hipermetilação do DNA de *ESR1* e/ou *PGR* e isto contribuiu para a pior sobrevida global e livre de doença. A presença da proteína MMP-2 foi avaliada em 44 amostras de tumores primários por imunohistoquímica. A compilação dos dados proteicos entre RE, RP e MMP-2, bem como a metilação de DNA da região promotora de *ESR1* e *PGR* nas amostras tumorais mostraram que, a análise concomitante entre estas marcas poderiam contribuir na prática clínica na análise de sobrevida global e livre de doença das pacientes. Para confirmar o padrão de expressão de MMP-2, a região promotora do gene amplificada e clonada em diferentes linhagens celulares de mama. A ausência de expressão do transcrito de *MMP2* na linhagem MCF7, e consequente expressão após ser tratada com o agente desmetilante 5-aza-2'-deoxicitidina (5-Aza) por 96h e com o inibidor de HADCs tricostatin A (TSA) por 16h confirmou a regulação epigenética de *MMP2*. O cultivo da linhagem tumoral de mama MCF7 com a fibronectina, uma importante proteína constituinte da matriz extracelular (MEC), além dos agentes citados, mostrou que houve uma variação do perfil de metilação global região promotora do gene *MMP2* obtendo os resultados de 90% de metilação quando tratada com 5-Aza, 86% com TSA e 61% com fibronectina após 5h. A interação da célula com a proteína por si só foi capaz de estimular a desmetilação da região promotora de *MMP2* em 30% no valor global da percentagem de metilação do DNA, assim como o observado com os agentes químicos. Nenhuma migração ou invasão da células foi observada. Após a

retirada da fibronectina a linhagem MCF7 foi recultivada por 48h. Os resultados de qPCR e sequenciamento mostraram que o processo de desmetilação de *MMP2* é um mecanismo rápido, dinâmico e transitório e este é o primeiro dado da literatura que mostra que a interação entre a célula tumoral e um constituinte da MEC é capaz de promover a desmetilação de genes associados ao processo metastático. Ensaios de imunoprecipitação de cromatina com a linhagem não mostraram diferenças entre as histonas de silenciamento gênico H3K9me3 e H3K27me3, mas observou-se um aumento da marca de abertura de transcrição da histona H3K4me3 na região promotora do gene *MMP2* após o cultivo com fibronectina por 5h ($p < 0,001$). Assim, o conjunto de dados obtidos com estes cinco genes reforçam que são necessárias diversas ferramentas metodológicas quando se envolve a progressão de tumores de mama. As diferentes conjecturas entre as moléculas envolvidas no processo de tumorigênese e como isto pode contribuir para a qualidade de vida da paciente tende ainda mais a um processo de análise individual do doente, capaz de auxiliar e anteceder o prognóstico das pacientes com câncer de mama.

Palavras-chave: desmetilação do DNA, quimiocinas, receptor de estrógeno, receptor de progesterona, fibronectina, câncer de mama, perfil de histona, metástase, PCR em tempo real, imunoprecipitação da cromatina.

ABSTRACT

Breast cancer is the second most common cancer type in the world and it is estimated that 90% of the deaths causes are due to metastasis. Important molecules are involved with this process: the chemokines are molecules involved in the signaling and addressing of metastasis sites, and hormone receptors are involved in cell proliferation, whereas the proteases present in the tumor microenvironment act in the degradation of matrix constituents. The epigenetic mechanisms such as DNA methylation and histone modifications are involved in expression regulating of various genes involved in all of these step process. Thus, *CXCR4*, *CXCL12*, *ESR1* and *PGR* genes were evaluated by DNA methylation analysis of the promoter region and the protein presence by immunohistochemistry in primary breast tumors and, additionally, the *MMP2* gene was also assessed by chromatin immunoprecipitation resulting in three scientific articles. DNA methylation of the *CXCR4* promoter region data showed that 67% of primary breast tumors analyzed had unmethylated region, which was associated with tumor stage, size, grade, lymph node metastasis, and patient's death. Moreover, DNA hypermethylation in promoter region of the genes *CXCL12* and *ESR1* showed significance values. Statistical analyzes of survival showed that the timing between the hypermethylation and unmethylation of *CXCL12/CXCR4*, respectively, is an important feature in overall survival and disease-free survival, and contributes to poor prognosis to patients. The methylation-specific PCR (MSP) results of the genes promoter region could help in assessing the progression of breast tumors. In clinical practice, the proteins estrogen receptor (ER) and progesterone (PR) presence by immunohistochemistry contributes to a better prognosis for patients and the lack of expression protein of these two genes is, in part, by DNA hypermethylation in breast carcinomas. About 80% of patients with metastasis and/or death showed DNA hypermethylation of *ESR1* and/or *PGR* genes and that contributes to a worse overall survival and disease-free survival. The presence of MMP-2 protein was measured on 44 samples of primary tumors by immunohistochemistry. The data compilation between ER, PR and MMP-2 proteins, as well DNA methylation of the genes promoters regions of *ESR1* and *PGR* in tumor samples, showed that concomitant analysis between these marks could contribute to clinical practice in the overall survival analysis and of disease-free survival of the patients. To confirm the expression pattern of MMP-2, the gene promoter region was amplified and cloned in different breast cancer cell lines. The *MMP2* transcript expression absence in the breast cancer cell line MCF7, and the gene expression after being treated with the demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine (5-Aza) for 96h, and with HADCs inhibitor Tricostatin A (TSA) for 16h confirmed the epigenetic regulation of *MMP2* gene. When the breast tumor cell line MCF7 was cultivated with fibronectin, a protein constituent of the extracellular matrix (ECM), in addition to these agents showed that there was a variation in the promoter region global methylation profile of the *MMP2* gene, obtained 90% methylation when treated with 5- Aza, 86% with TSA and 61% after 5h with fibronectin. The interaction of the cell with the protein alone was capable of stimulating of the *MMP2* promoter region demethylation in 30% of the total global DNA methylation, as observed with chemical agents. No migration or invasion of cells was observed. After removal of the fibronectin of the cell line MCF7 culture, the breast cell was cultivated for 48 h. qPCR results and sequencing showed that the *MMP2* demethylation process is a fast, dynamic and transient mechanism. It is the first literature data showing that the interaction between tumor cells and the ECM component is capable of promoting gene demethylation associated with the metastatic process. Chromatin immunoprecipitation

assays not showed differences between the gene silencing histone H3K9me3 and H3K27me3 marks, although it was observed an increase in the opening tag of transcription of histone H3K4me3 in the *MMP2* gene promoter region after culture with fibronectin by 5h ($p < 0.001$). Thus, the data obtained with these five genes further evidence that several methodological tools are necessary when it involves the progression of breast tumors analysis. The various conjectures among the molecules involved in the tumorigenesis process and how this can contribute to the patient's life quality tends further to a process of analysis of the individual patient, and able to assist precede the patients with breast cancer prognosis.

Keywords: DNA demethylation, chemokines, estrogen receptor, progesterone receptor, fibronectin, breast cancer, histone profile, metastasis, real-time PCR, chromatin immunoprecipitation.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1 ESTATÍSTICAS SOBRE O CÂNCER	18
1.2 ESTATÍSTICAS DO CÂNCER DE MAMA	18
1.3 O CÂNCER DE MAMA: DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO	20
1.3.1 Receptor de Estrógeno (RE) e o gene <i>ESR1</i>	21
1.3.2 Receptor de Progesterona (RP) e o gene <i>PGR</i>	22
1.4 EPIGENÉTICA	23
1.4.1 Metilação do DNA	23
1.4.2 DNA metil-transferases: particularidades	25
1.4.3 Desmetilação do DNA	26
1.4.4 Influência da Metilação do DNA	29
1.4.5 Modificações pós-traducionais das histonas	30
1.4.6 RNAs não codificadores	34
1.5 MARCADORES DE METILAÇÃO DO DNA NO CÂNCER DE MAMA	35
1.6 O PROCESSO METASTÁTICO	36
1.6.1 Modelo de Progressão Linear	37
1.6.2 Modelo de Progressão Paralela	38
1.7 MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NAS METÁSTASES	40
1.7.1 O papel das Quimiocinas no processo metastático	40
1.7.2 O papel das Metaloproteases no processo metastático	41
1.7.3 Gelatinase A, Metaloprotease-2 ou MMP-2	44
1.7.4 Os processos de regulação da MMP-2	45
2. JUSTIFICATIVA	49
3. OBJETIVOS	51
3.1 GERAL	51
3.2 ESPECÍFICOS	51
Separata 1 – artigo CXCR4	52
Separata 2 – artigo em submissão	54
Separata 3 – artigo em preparação	56
4. MATERIAL E MÉTODOS	58
4.1 MATERIAL BIOLÓGICO	58
4.2 CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DA ILHA DE CPG 2 DO GENE <i>MMP2</i>	58
4.2.1 Extração de DNA	58
4.2.2 Tratamento de DNA com Bissulfito de Sódio	58
4.2.3 Análise <i>in silico</i> do gene <i>MMP2</i>	59
4.2.4 Clonagem da ilha de CpG do gene <i>MMP2</i> de diferentes linhagens tumorais de mama	60
4.3 AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DO GENE <i>MMP2</i> EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA	61
4.4 TRATAMENTOS NO CULTIVO DA LINHAGEM MCF7	61
4.4.1 Tratamento com 5-aza-2'-deoxicitidina (5-Aza) e Tricostatin A (TSA)	62
4.4.2 Cultivo com Fibronectina	62
4.5 ENSAIOS DO POTENCIAL MIGRATÓRIO E INVASIVO DA MCF7	62
4.5.1 Ensaio de Migração haptotática	63
4.5.2 Ensaio de Invasão quimiotática em <i>transwell</i>	63
4.5.2.1 Revelação por DAPI e Cristal Violeta	63
4.5.3 Ensaio de Invasão tridimensional em matrizes de colágeno	64
4.6 IMUNOPRECIPITAÇÃO DE CROMATINA DA LINHAGEM MCF7 – ChIP	65

4.7 QUANTIFICAÇÃO POR qPCR DAS AMOSTRAS TRATADAS	66
4.7.1 Quantificação dos transcritos após extração de RNA	66
4.7.2 Quantificação por qPCR após a imunoprecipitação de cromatina	66
4.8 ANÁLISE DA ATIVIDADE DE METALOPROTEASE DE MMP-2	68
5 RESULTADOS	69
5.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE <i>MMP2</i> EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA	69
5.2 PERFIL DE METILAÇÃO DA ILHA DE CpG 2 DO GENE <i>MMP2</i> EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA	69
5.2.1 Perfil de Metilação da Ilha de CpG 2 do gene <i>MMP2</i>	70
5.2.2 Efeito da inibição da metilação do DNA e da desacetilação de histonas na expressão do gene <i>MMP2</i>	72
5.2.3 Efeito da inibição da metilação do DNA e da desacetilação de histonas na sequência da ilha de CpG 2 do gene <i>MMP2</i>	72
5.3 ATUAÇÃO DA FIBRONECTINA NA EXPRESSÃO DO GENE <i>MMP2</i> NA LINHAGEM MCF7	74
5.3.1 PCR em Tempo Real	75
5.3.2 Ensaio de atividade da MMP-2 por Zimografia.....	76
5.3.3 Metilação Global da ilha de CpG 2 do gene <i>MMP2</i> após cultivo com fibronectina	76
5.4 POTENCIAL MIGRATÓRIO E INVASIVO DA LINHAGEM MCF7	79
5.4.1 Efeito do recultivo da linhagem MCF7 tratada com fibronectina na metilação da ilha de CpG 2 do gene <i>MMP2</i>	81
5.5 IMUNOPRECIPITAÇÃO DA CROMATINA	82
6 DISCUSSÃO	85
7 CONCLUSÃO	92
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
ANEXOS	107

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	TAXA DE MORTALIDADE DE MULHERES POR NEOPLASIA AJUSTADAS POR IDADE NO BRASIL	18
FIGURA 2	RANKING MUNDIAL DA TAXA DE MORTALIDADE DE MULHERES POR CÂNCER DE MAMA EM 2010	19
FIGURA 3	FORMAÇÃO DA METIL-CITOSINA (⁵ meC) PELAS DNA METIL TRANSFERASES (DNMT)	23
FIGURA 4	DESMETILAÇÃO PASSIVA DO DNA	26
FIGURA 5	O PAPEL DA 5HMEC NA DESMETILAÇÃO ATIVA DO DNA	26
FIGURA 6	DESMETILAÇÃO ATIVA DO DNA	27
FIGURA 7	REPRESENTAÇÃO DE ILHAS DE CpG EM PROMOTORES DE GENES	28
FIGURA 8	MODIFICAÇÕES PÓS TRADUCIONAIS NA HISTONA H3	30
FIGURA 9	ATUAÇÃO DA HAT E HDAC NA ACETILAÇÃO DE RESÍDUOS DE LISINAS	32
FIGURA 10	MODELO “CHUVEIRO LETAL DE METÁSTASES”	36
FIGURA 11	MODELO DE PROGRESSÃO PARALELA	38
FIGURA 12	CLASSES DAS METALOPROTEASES	41
FIGURA 13	ELEMENTOS REGULATÓRIOS NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>MMP2</i> HUMANO	43
FIGURA 14	REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DE MMP-2 VIA PROTEÍNA RECK	45
FIGURA 15	ESTRUTURA DA FIBRONECTINA E SEUS SÍTIOS DE LIGAÇÕES	46
FIGURA 16	ILHAS DE CpG DO GENE <i>MMP2</i>	58
FIGURA 17	ILHA DE CpG 2 DO GENE <i>MMP2</i> AMPLIFICADA POR PCR	59
FIGURA 18	RT-PCR DOS GENES <i>MMP2</i> E <i>GAPDH</i> EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA	68
FIGURA 19	PERFIL DE METILAÇÃO DA ILHA DE CpG 2 DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE <i>MMP2</i> EM LINHAGENS DE MAMA	70
FIGURA 20	RT-PCR DA LINHAGEM MCF7 CULTIVADA COM 5-AZA, TSA E 5-AZA+TSA	71
FIGURA 21	SEQUENCIAMENTO DA ILHA 2 DO GENE <i>MMP2</i> DA LINHAGEM MCF7 TRATADA COM 5-AZA, TSA E AMBOS	73
FIGURA 22	RT-PCR MCF7 CULTIVADA COM FIBRONECTINA	74
FIGURA 23	qPCR DE <i>MMP2</i> NA LINHAGEM MCF7 SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO	75
FIGURA 24	ZIMOGRAMA DA LINHAGEM MCF7 E SEUS TRATAMENTOS	76
FIGURA 25	PERFIL DE METILAÇÃO DA LINHAGEM MCF7 APÓS CULTIVO COM FIBRONECTINA	77
FIGURA 26	PERCENTAGEM DE DESMETILAÇÃO APÓS OS TRATAMENTOS DA LINHAGEM MCF7	78
FIGURA 27	ENSAIO DE MIGRAÇÃO DA LINHAGEM MCF7 TRATADA COM FIBRONECTINA	80

FIGURA 28	ENSAIO DE MTS (<i>MULTICELLULAR TUMOR SPHEROIDS</i>) DA LINHAGEM MCF7 TRATADA COM FIBRONECTINA	81
FIGURA 29	PERFIL DE SEQUENCIAMENTO DA LINHAGEM MCF7 CULTIVADA COM FIBRONECTINA E RECULTIVADA POR 48h SEM FIBRONECTINA	82
FIGURA 30	LOCALIZAÇÃO DOS INICIADORES PARA A REAÇÃO DE qPCR DA ChIP	83
FIGURA 31	RESULTADO DE qPCR DA ChIP	84
FIGURA 32	MODELO DE ATIVAÇÃO DO GENE MMP2 PELA FIBRONECTINA EM CÉLULAS MCF7	94

LISTA DE ABREVIATURAS

5hmeC-DG - 5hmC DNA glicosilase específica
5meC - 5-metilcitosina
8oxoG - 8-oxoguanina
CGIs - Ilhas de CpG
CTEs - células-tronco embrionárias
CT-PCPE – do inglês *procollagen carboxy-terminal proteinase enhancer*
DNMTs - DNA Metiltransferases
EZH2 - enhancer do zeste homólogo 2
FAK – quinase de adesão focal
FN - fibronectina
GPI – glicosil fosfatidil inositol
HATs – histonas acetilases
HDACs – histonas deacetilases
HDI - inibidores de HDAC
HDMs - histonas demetilases
HMTs - histonas metilases
IL-2 - Interleucina-2
miRNAs - microRNAs
MMP – metaloprotease de matriz
MTS – do inglês *microtissue spheroids*
ncRNAs - RNAs não codificantes
PI-3K – fosfoinositol 3 quinase
RECK – do inglês *Reversion inducing Cystein rich protein*
SAH - S-adenosil-L-homocisteína
SAHA - ácido suberoil anilida hidroxamica
snoRNAs - RNAs nucleolares
TA – temperatura ambiente
TEM - transição epitelial-mesenquimal
TET - proteínas de translocação dez-onze, ou *ten-eleven-translocation*
TFPI-2 – do inglês *tissue factor pathway inhibitor-2*
TGF- β - fator transformante de crescimento β
TIMP - inibidor tecidual das metaloproteinases
TLD – do inglês *targeted lesion-induced demethylation*
TMD – do inglês *targeted modification-induced demethylation*
TSS - início de transcrição

INTRODUÇÃO

1.1 ESTATÍSTICAS SOBRE O CÂNCER

O câncer constitui-se um grande problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde estima que no ano 2030 haverá 27 milhões de novos casos de câncer, 75 milhões de pessoas vivendo com câncer e 17 milhões de mortes por causa do câncer. O câncer constitui a segunda causa de morte depois das doenças vasculares, representando 23% do total. Cerca de 1.660.290 novos casos de câncer e 580.350 casos de óbito são estimados nos Estados Unidos para o ano de 2013, totalizando quase 1600 mortes por dia (Siegel *et al.*, 2013). No Brasil, a previsão para o ano de 2012 apontaram a ocorrência de 518.510 novos casos reforçando a magnitude do problema do câncer no país. Deste total, 257.870 serão casos novos para o sexo masculino e 260.640 para o sexo feminino. Confirma-se a estimativa que o câncer da pele do tipo não melanoma é o mais incidente na população brasileira, seguido pelos tumores de próstata, mama feminina, cólon e reto, pulmão, estômago e colo do útero. Para o sexo feminino destacam-se, entre os cinco mais incidentes, os tumores de pele não melanoma (71 mil casos novos), mama (53 mil), colo do útero (18 mil), cólon e reto (16 mil) e pulmão (10 mil) (Inca, 2012).

1.2 ESTATÍSTICAS DO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres. Entre as americanas, a incidência é de que 29% dos casos de câncer serão os de mama (Siegel *et al.*, 2013). No Brasil, as taxas de mortalidade por câncer de mama apresentaram a estimativa de 52.680 novos casos para o ano de 2012. Embora se observe uma relativa manutenção no número de casos a partir de 2007, a incidência de morte por câncer de mama supera outros três tipos de neoplasias mais frequentes entre as mulheres (traquéia, brônquios e pulmões; cólon e reto, cólo de útero e estômago) (Figura 1).

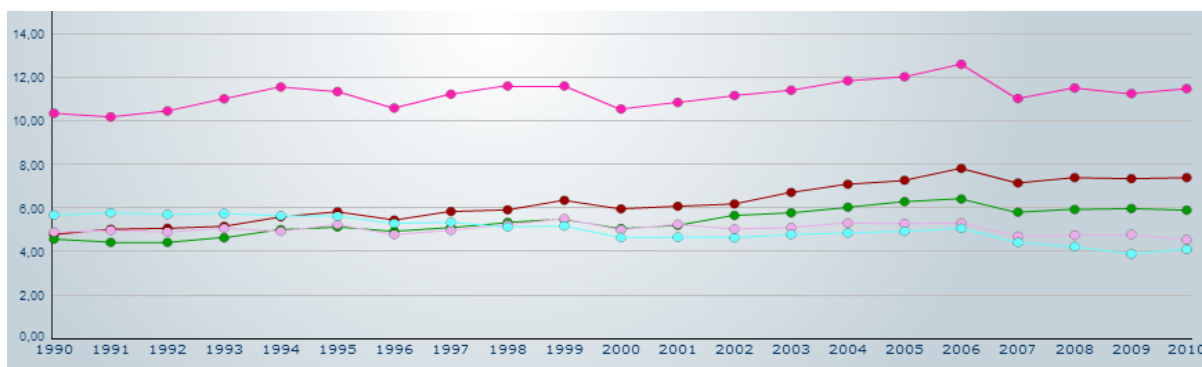


FIGURA 1 – TAXA DE MORTALIDADE DE MULHERES POR NEOPLASIA AJUSTADAS POR IDADE NO BRASIL. Taxas de morte de mulheres – a cada 100 mil - para os três tipos de neoplasias mais frequentes no gênero. O eixo y do gráfico corresponde às percentagens de óbito correspondentes a cada neoplasia. Dados de 1990 até 2010. A linha rosa corresponde ao câncer de mama, marrom ao câncer de traqueia, brônquios e pulmões, a linha verde ao câncer de cólon e reto, a linha lilás ao câncer de útero e a linha turquesa corresponde ao câncer de estômago.

Fonte: Disponível em <http://mortalidade.inca.gov.br/Mortalidade/>

A manutenção na taxa de mortalidade durante os últimos anos deve-se, principalmente, pela extensão de programas de diagnóstico precoce e aumento do acesso a mamografia (Freitas-Junior *et al.*, 2012). Embora seja relativamente rara antes dos 35 anos, acima dessa idade a incidência cresce rápida e progressivamente, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento (Inca, 2012). Segundo a agência internacional de pesquisas do câncer da Organização Mundial da Saúde¹ o Brasil encontra-se em 10º lugar no ranking mundial, com elevadas taxas de incidência e de mortalidade (Figura 2). Estes números só reforçam o quanto ainda é necessário a descoberta de novas ferramentas de diagnóstico, de amplo acesso e que possam atender as necessidades das pacientes.

¹ Dados disponíveis em <http://globocan.iarc.fr/>

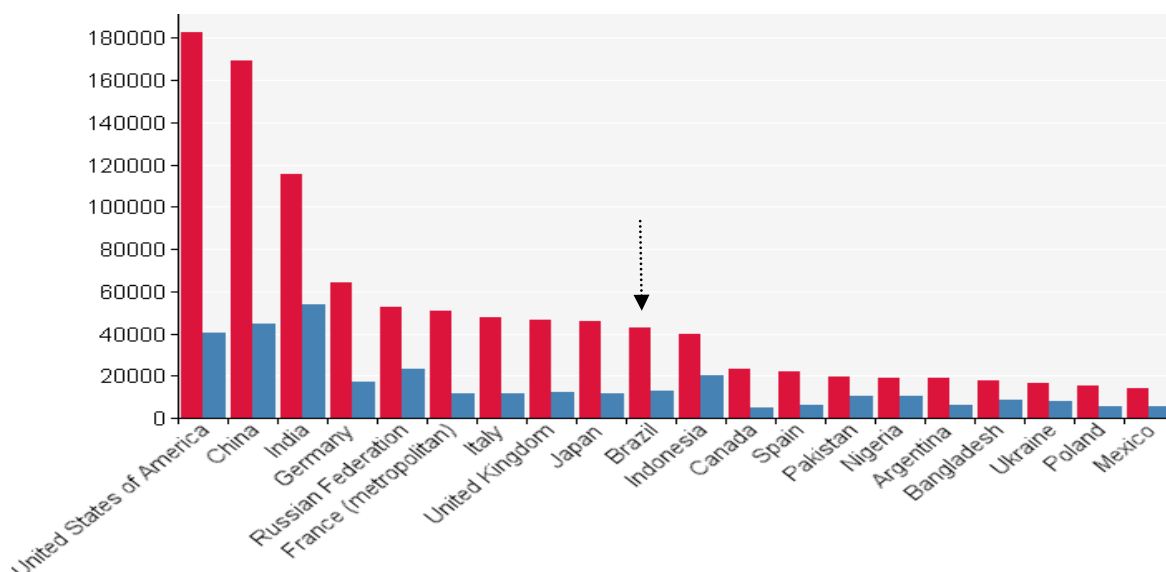


FIGURA 2 – *RANKING* MUNDIAL DA TAXA DE MORTALIDADE DE MULHERES POR CÂNCER DE MAMA EM 2010. O gráfico mostra a ordem dos países em incidência de casos (barras em vermelho) enquanto as barras azuis mostra a taxa de mortalidade, em números absolutos (eixo y). O Brasil encontra-se em 10º lugar na lista, com o números de óbito muito altos em relação ao números de casos, comparado aos Estados Unidos e China, por exemplo, os primeiros do *ranking* em incidência.

Fonte: Disponível em <http://globocan.iarc.fr>

1.3 O CANCER DE MAMA: DIAGNÓSTICO E TRATAMENTO

Todos os tipos de câncer são caracterizados por uma sucessão de alterações em vários genes. Segundo Hanahan e Weinberg (2000), existem seis alterações celulares comuns à maioria dos cânceres tais como a (1) auto-suficiência em fatores de crescimento, a (2) insensibilidade a fatores inibitórios de crescimento, a (3) evasão das células à morte por apoptose, o (4) potencial replicativo ilimitado, a (5) angiogênese sustentada e (6) invasão tecidual e metástase. Dois novos emergentes marcadores do câncer foram inseridos nesta definição e envolvem (7) a reprogramação da energia metabólica pela célula tumoral para suportar o contínuo crescimento e proliferação e (8) a evasão ativa das células tumorais às células do sistema imune (Hanahan & Weinberg, 2011). A diminuição nas taxas de mortalidade também é influenciada pelo quão rápido o diagnóstico é capaz de detectar a massa tumoral ou seu foco metastático. Dados como tamanho do tumor, grau de diferenciação, número de linfonodos comprometidos, a marcação de receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP) bem como a amplificação de

HER2/neu, a super expressão de Bcl-2 ou p53, ou as mutações de *BRCA1* e *BRCA2* são considerados úteis no diagnóstico do câncer de mama (Harris, 1996). RE e RP são proteínas receptoras de hormônios estrógeno e progesterona, respectivamente, e a presença das mesmas em imunohistoquímica indica o prognóstico da doença sendo que, quanto maior a quantidade desses marcadores, melhor o tempo de sobrevida. Além disso, a marcação positiva dessas proteínas indica à terapia hormonal. Essa terapia utiliza a droga tamoxifeno que é um modulador seletivo do receptor de estrógeno e que compete com o estradiol pela ligação ao receptor. Nas células mamárias, esta competição previne a formação do complexo transcricional mediado por esta ligação, bloqueando a proliferação sítio-dirigida das células tumorais em resposta ao estradiol (Droog *et al.*, 2013). Já a super expressão de HER2, outro importante marcador utilizado na imunohistoquímica, indica a ocorrência de tumores altamente proliferativos e com pior prognóstico. Para diminuir sua expressão foi desenvolvido uma terapia com anticorpos monoclonais (trastuzumab) utilizada nas pacientes HER2 positivas (Sotiriou *et al.*, 2009).

1.3.1 Receptor de Estrógeno (RE) e o gene *ESR1*

A proteína do receptor de estrógeno (RE) produzida a partir do gene *ESR1* que está localizado no cromossomo 6q25.1, possui duas isoformas: a alfa (RE α) e a beta (RE β) com alto grau de homologia de aminoácidos (Ikeda & Inoue, 2004). O estrógeno é um conjunto de hormônios esteroidais e dentre eles o 17- β -estradiol é o mais abundante. Estas moléculas exercem importantes funções biológicas em tecidos alvos como os órgãos reprodutivos. Entre esses tecidos, o crescimento da glândula mamária, do endométrio durante a gestação e o ciclo menstrual são dependentes de estrógenos. Além dos efeitos proliferativos em células normais, o estrógeno é considerado um estimulante para a iniciação e promoção de tumores nesses órgãos. A estimulação da proliferação celular mediada pela exposição prolongada aos estrógenos aumenta a probabilidade de erros espontâneos na replicação do DNA. Existem pelo menos quatro vias de ação e dentre estas, três são genômicas (Cheskis *et al.*, 2007). A via clássica de ação dos estrogênios ocorre pela ligação entre o hormônio e o seu receptor, que migram para o núcleo e se ligam diretamente ao DNA em sítios denominados de ERE (elemento responsivo ao estrógeno). Na segunda via, o complexo hormônio-receptor pode se ligar a outras moléculas que farão a conexão

à região de DNA alvo. A terceira via, menos comum, constitui da ligação direta do receptor mediada pela sua alteração conformacional ao sítio ERE sem a ligação prévia com o hormônio. Na quarta via de ativação, ou via não genômica, o complexo hormônio-receptor não migra para o núcleo, mas age sobre a membrana celular ativando uma cascata de eventos que estimulam a proliferação celular, a angiogênese, e a imortalização celular, auxiliando na progressão direta de tumores (Giacinti *et al.*, 2006; Krolík & Milnerowicz, 2012).

Os tratamentos às pacientes seguem os padrões estabelecidos quanto à positividade dos receptores hormonais. No entanto, o RE apresenta uma função paradoxal no câncer de mama. Ao mesmo tempo em que pacientes de alto grau, mas com elevada expressão de RE apresentam melhor prognóstico comparado às pacientes RE negativo, a estimulação estrogênica em células sadias pode levar ao aumento do risco de desenvolver o câncer (Hervouet *et al.*, 2013, Droog *et al.*, 2013).

1.3.2 Receptor de Progesterona (RP) e o gene *PGR*

A proteína do receptor de progesterona (RP) produzida a partir do gene *PGR* que está localizado no 11q22 é importante para o desenvolvimento da glândula mamária e do aparelho reprodutor feminino. O receptor de progesterona promove a proliferação celular e pode ser expresso tanto em tecidos normais quanto em neoplásicos (Liu *et al.*, 2004). Normalmente, em tecidos normais, as células expressam as duas isoformas (RPA e RPB) em níveis equivalentes; enquanto que, em tumores, predomina a expressão da RPA (Graham *et al.*, 2005).

A ausência de RP pode ser um marcador de crescimento alterado e, por conseguinte, um mecanismo para a resistência anti-estrogênio (Kurbel, 2013). A presença de RE e RP em tumores está diretamente relacionada com a terapia hormonal. Estudos mostram que tumores de mama RE positivo e RP negativo ou RE e RP positivo são clínica e biologicamente distintos (Arpino *et al.*, 2004). Em geral, os tumores que são RE+ e RP- representam um subconjunto distinto de câncer de mama com características agressivas e mau prognóstico (Marjoribanks *et al.*, 2012). Em particular, estes tumores RE+/RP- têm níveis mais elevados de receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e HER2 quando comparados a tumores RE+/PR+ (Rakha *et al.*, 2007; Kurbel, 2013). Outros autores relatam que o papel de RP no prognóstico em câncer de mama, especialmente do subgrupo de tumores RE+/RP-, é bem mais significativo. Canello e colaboradores (2012) observaram que pacientes

com câncer de mama triplo positivo tiveram uma melhor sobrevida em relação às pacientes RE+/RP-/HER2+ ou RE+/RP-/HER2- e que isso estava condicionado à função do RP em carcinoma de mama nos estágios iniciais da doença. Além disso, a condição da presença ou ausência de RP poderia interferir no tratamento quimioterápico destas pacientes (Cancello *et al.*, 2012).

1.4 EPIGENÉTICA

O termo epigenética foi descrito em 1942 e define as interações entre o genoma e o ambiente que levam a formação do fenótipo (Waddington, 1942 *apud* Murrel *et al.*, 2005). Trata-se de um fenômeno que envolve a alteração herdável da expressão gênica que não implica em uma alteração da sequência de nucleotídeos e sim, uma modificação da conformação do DNA (Bird, 2002). O conhecimento do modo como a estrutura da cromatina é organizada e mantida é a chave para compreender as origens das alterações epigenéticas no desenvolvimento embrionário, na diferenciação celular e nas doenças.

A metilação das citosinas no DNA e as modificações pós-traducionais nas histonas são as modificações epigenéticas mais estudadas. Na última década, porém, vem se destacando as pesquisas sobre os RNAs não codificantes. As alterações epigenéticas são capazes de modificar a expressão gênica interferindo no acesso de fatores transcricionais ao DNA. Assim, a mesma sequência de DNA nas células de um organismo multicelular pode mostrar fenótipos alternativos que são relacionados a diferentes estados epigenéticos (Jones, 2012).

1.4.1 Metilação do DNA

A modificação epigenética melhor descrita em eucariontes é a metilação do carbono 5 de citosinas (5meC) adjacentes a guaninas (Bird, 2002). Esta reação é catalisada pelas enzimas DNA metil transferases (DNMTs). O S-adenosil-L-metionina (SAM) é o doador universal de metil que é covalentemente ligado ao carbono 5 do anel pirimídico da citosina liberando o S-adenosil-L-homocisteína (SAH) (Razin & Riggs, 1980) (Figura 3).

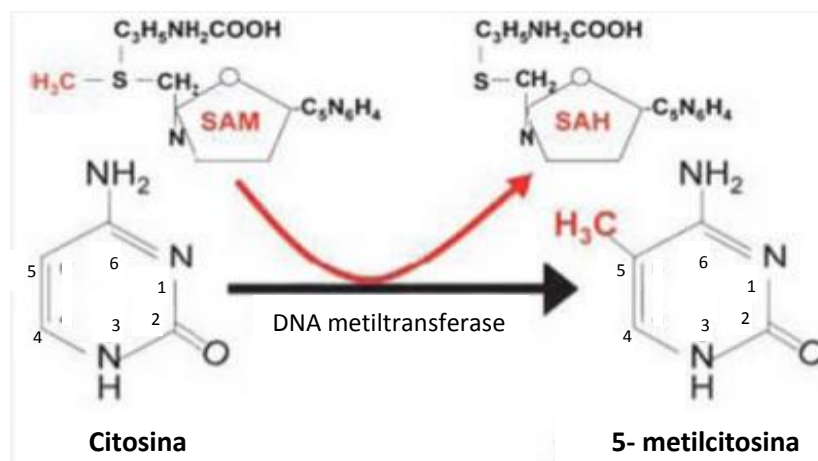


FIGURA 3 – FORMAÇÃO DA METIL-CITOSINA (^5meC) PELAS DNA METIL TRANSFERASES (DNMT). A s-adenosil metionina (SAM - à esquerda da figura) doa grupamentos metil à citosina que, pela ação catalítica da enzima DNA metiltransferase (DNMT), insere este grupamento no carbono 5 de citosinas. Ao final do processo o composto S-adenosil-homocisteína (SAH - à direita da figura) é liberado e há a formação da 5-metil-citosina.

Nota: em vermelho na SAM está mostrado o grupo metil que será doado para a reação. Este grupo também está em vermelho no 5-metil-citosina. O número das ligações no anel pirimídico da citosina estão mostrados na base.

Fonte: Attwood *et al.*, 2002.

A metilação de citosinas nos mamíferos ocorre quase exclusivamente no contexto citosinas/guaninas (dinucleotídeos CpG), embora citosinas metiladas tenham sido documentadas também no contexto CpA ou CpT em oócitos e embriões pré-implantados (Woodcock *et al.*, 1987 *apud* Tomizawa *et al.*, 2011). A distribuição de marcas de metilação ao longo do genoma não é aleatória. A maioria dos CpGs encontram-se em regiões de transposons que ocupam aproximadamente 40% do genoma humano e representam um potencial auxílio à função e estabilidade do genoma (Goll & Bestor, 2005; Dahl *et al.*, 2011). Em geral, uma densa metilação de promotores gênicos está associada com o silenciamento de genes (Bird, 2002). A metilação da citosina desempenha um papel chave em processos fisiológicos. Diversos mecanismos regulatórios de genes dependem da metilação do DNA, incluindo a inativação do cromossomo X em fêmeas e o silenciamento de alelos específicos de genes do pai ou da mãe (*imprinting*) (Jones & Baylin, 2002). Algumas síndromes em humanos são causadas por alterações no padrão de metilação do *imprinting* (Lim & Maher, 2010) ou por mutações de genes que codificam importantes ferramentas na maquinaria da metilação do DNA (Amir *et al.*, 1999). Adicionalmente, alterações no padrão de metilação do DNA têm sido relacionado, além do câncer, às

doenças auto-imunes (Teitell *et al.*, 2003), neurológicas e psiquiátricas (Jiang *et al.*, 2008).

A 5meC é conhecida como sendo a quinta base do genoma eucarionte (5meC) (Widschwendter, 2007) e ocorre em cerca de um por cento do genoma (Ehrlich *et al.*, 1982). Bioquimicamente, a metilação do DNA serve a múltiplos propósitos (Franchini *et al.*, 2012): (a) as forças de Van der Waals alteram o raio em torno da citosina pela adição de um grupo metil, (b) altera o potencial de empilhamento de base da citosina, possivelmente influenciando o enrolamento em torno das histonas (Acosta-Silva *et al.*, 2010) (c) inibe a ligação de algumas proteínas de ligação ao DNA (Tate & Bird, 1993) e (d) podem melhorar a ligação de proteínas de ligação a metil-CpG (Zou *et al.*, 2011). Esta base pode recrutar proteínas de ligação denominadas de *methyl binding protein* (MBD), que auxiliam na conformação de cromatina reprimida (Bird, 1992).

1.4.2 DNA metil-transferases: particularidades

O processo de metilação é catalisado pelas enzimas DNA metiltransferases (DNMTs) (Figura 3). As enzimas DNMT1, DNMT3a e DNMT3b são responsáveis pelo estabelecimento e manutenção da metilação (Takeshita *et al.*, 2011). As três DNMTs são necessárias para o desenvolvimento embrionário ou neonatal (Li *et al.*, 1992) e a ausência total de metilação é incompatível com a viabilidade de células somáticas (Jackson-Grusby *et al.*, 2001) ou de células cancerosas (Chen *et al.*, 2007), mas não de células-tronco embrionárias (Tsumura *et al.*, 2006; Jones, 2012).

A DNMT1 é expressa durante a fase de pré-implantação do óvulo e é crucial para o desenvolvimento embrionário de mamíferos (May *et al.*, 2009). Possui diversas isoformas sendo a DNMT1 somática diferente da expressa em oócitos - dnmt0 (Mertineit *et al.*, 1998). Durante o estabelecimento do padrão de metilação as modificações são mantidas pela DNMT1 que garante o padrão durante a replicação (Li *et al.*, 1992). A DNMT1 preferencialmente metila sequências de DNA hemimetiladas que aparecem imediatamente após a replicação ou reparação (Williams, 2012). Sabe-se que a metilação da cadeia complementar no mesmo sítio CG da cadeia oposta é rápida e altamente eficiente e esta metilação de manutenção também é realizada em menor escala, pelas DNMT3a e DNMT3b (Baylin & Jones, 2011).

1.4.3 Desmetilação do DNA

O genoma de mamíferos passam por duas etapas de desmetilação global. A primeira etapa ocorre nas células germinativas primordiais e a segunda durante a fase de pré-implantação (Anderson *et al.*, 2000; Hajkova *et al.*, 2010). Após oito horas de fertilização e antes da replicação começar, o pró-núcleo do DNA paterno é ativamente desmetilado (Mayer *et al.*, 2000, Rivera & Ross, 2013) enquanto o genoma materno herdado é desmetilado passivamente a cada divisão celular até a fase de blastocisto, onde a desmetilação se completa (Howlett & Reik, 1991).

Apesar desse conhecimento sobre a desmetilação do DNA ocorrendo de forma independente da replicação celular, até o momento não foi descrita uma DNA desmetilase. Essa busca pela(s) demetilase(s) de DNA tem sido longa, com muitos falsos resultados (Ooi *et al.*, 2007), sendo que agora é amplamente aceito a existência destas enzimas (Wu & Zhang, 2011; Branco *et al.*, 2012). Há trabalhos que mostram que a desmetilação ativa pode ser conseguida, embora seja necessário um mecanismo que envolva a divisão celular, ou a reparação do DNA e a excisão de bases, ao invés da remoção direta do grupo metil (Popp *et al.*, 2010). Os dados mais surpreendentes dos últimos anos sobre o processo de desmetilação DNA foi a identificação de outras bases, ou intermediários do processo de metilação. O dano oxidativo é responsável pela formação de bases modificadas, incluindo a oxidação da guanina (G) à 8-oxoguanina (8oxoG) e a oxidação da 5-metilcitosina (5meC) à 5-hidroxi-metilcitosina (5hmeC) (Rivera & Ross, 2013). Além da presença da 5-hidroxi-metilcitosina (5hmeC), nas próximas etapas de oxidação ocorre a formação da 5-formil-citosina (5fmC) e 5-carboxil-citosina (5caC) sendo inclusive consideradas como a sexta, sétima e oitava bases do DNA, respectivamente (He *et al.*, 2011; Ito *et al.*, 2011; Jones, 2012). A 5hmeC foi inicialmente descrita em bacteriófagos (Wyatt & Cohen, 1952 *apud* Dahl *et al.*, 2011) e vista como componente de aproximadamente 15% de todas as citosinas do DNA de cérebro de ratos adultos, camundongos e sapos (Penn *et al.*, 1972 *apud* Dahl *et al.*, 2011). No entanto, somente anos depois sua participação na metilação foi determinada (Kriaucionis & Heintz, 2009; Tahiliani *et al.*, 2009).

O papel da 5meC é codificar de modo estável o silenciamento transcricional herdável (Bird, 2002), enquanto que a função da 5hmeC ainda não foi esclarecida (Kriaucionis & Heintz, 2009). Além disso, estudos sugerem que componentes da maquinaria da metilação podem reagir de modo diferente à 5meC e 5hmeC (Figura 4)

(Ordog *et al.*,2012). A primeira sugestão é que a 5hmeC impediria a DNMT de metilar a citosina alvo em uma região qualquer contendo o intermediário e que, a medida que ocorre a divisão celular, ocorreria a desmetilação passiva do DNA (Valinluck *et al.*,2007).

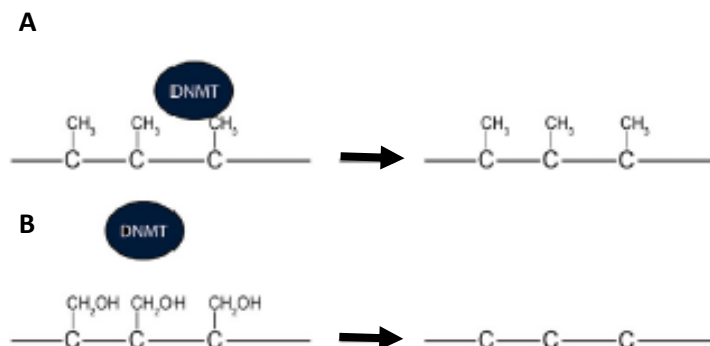


FIGURA 4 – DESMETILAÇÃO PASSIVA DO DNA. **A)** A 5meC é reconhecida pelas DNMTs que mantém o padrão de metilação nas citosinas durante a replicação. **B)** A 5hmeC não é reconhecida pelas DNMTs resultando na perda progressiva da metilação durante sucessivas divisões celulares.

Fonte: Dahl *et al.*,2011.

O segundo ponto discutido é que a 5hmeC poderia ser um intermediário chave na desmetilação ativa do DNA envolvendo mecanismos de reparo à molécula (Tahiliani *et al.*, 2009) (Figura 5).

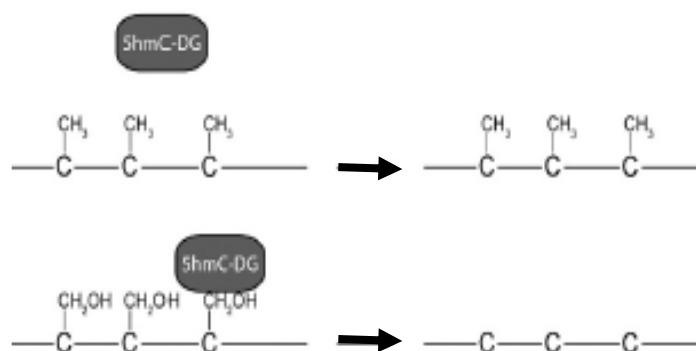


FIGURA 5 – O PAPEL DA 5HMEC NA DESMETILAÇÃO ATIVA DO DNA. A 5hmC-DNA glicosilase específica (5hmC-DG) não reconhece a 5meC e o padrão de metilação é mantido. Já a 5hmeC pode ser reconhecida pela 5hmC-DG e é capaz de convertê-la à citosina, promovendo a desmetilação ativa do DNA.

Fonte: Dahl *et al.*,2011.

E terceiro, as proteínas de ligação às regiões metiladas (MBD), que por sua vez recrutam histonas deacetilases, não reconhecem a 5hmeC sendo incapazes de reprimir a transcrição. Alternativamente, a atividade transcricional poderia ser

influenciada por proteínas ainda não conhecidas que seletivamente reconhecem as 5hmeC (Dahl *et al.*, 2011) (Figura 6). Além disso, a 5hmeC pode ser um intermediário para a desmetilação ativa envolvendo a glicosilação ou deaminação em 5hmeU, que é então removido por excisão de bases e reparo ou pela formação e subsequente descarboxilação do 5caC (He *et al.*, 2011; Jones, 2012).

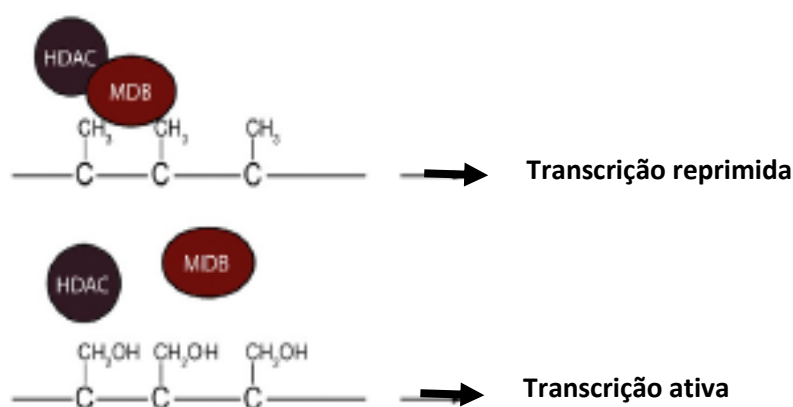


FIGURA 6 – DESMETILAÇÃO ATIVA DO DNA. Enquanto as 5meC são reconhecidas pelos complexos repressores (HDAC e MBD) que promovem a repressão da transcrição; a 5hmeC não é reconhecida pelas MBD (*methyl binding protein*), que por sua vez, não recrutam as histonas deacetilases (HDACs) levando a formação de uma cromatina transcricionalmente ativa.

Fonte: Dahl *et al.*, 2011.

Tahiliani e colaboradores (2009) identificaram o grupo de enzimas capazes de converter 5meC à 5hmeC atuando sobre a molécula de DNA totalmente e/ou parcialmente metilado. As proteínas de translocação dez-onze, ou *ten-eleven-translocation* (TET) atuam nos processos de desmetilação em células musculares (Tsumagari *et al.*, 2013), na regulação do gene *RB* importante na proliferação celular (Huang *et al.*, 2013), na diferenciação de células neuronais (Hahn *et al.*, 2013) e em processos neoplásicos (Zhuang *et al.*, 2012). As TETs 1, 2 e 3 de mamíferos são capazes de promover a conversão de 5meC à 5hmeC em células tronco de modelos murinos, entretanto, somente a depleção de TET1 mostrou comprometer a capacidade de auto-renovação e a manutenção destas células (Ito *et al.*, 2010). Mutações na TET2 podem levar à hipermetilação de ilhas de CpG em câncer, enquanto a ausência de TET3 têm sido relatada a uma falha de desmetilação em ilhas de CpG e em genes essenciais, tais como o *Oct4* ou *Nanog* no genoma paterno (Gu *et al.*, 2011; Wossidlo *et al.*, 2011).

1.4.4. Influência da Metilação do DNA

A metilação do DNA é um mecanismo fundamental no silenciamento gênico e na manutenção da estabilidade da estrutura cromossômica (Reik, 2007). Promotores de mamíferos pertencem a duas categorias diferentes, em termos de composição de base e a metilação de DNA. As regiões que têm um elevado teor de G+C em relação à média do genoma são denominadas “Ilhas de CpG” (CGIs). Pelo menos 60% dos promotores dos genes que codificam proteínas estão associadas a uma ilha de CpG (Bird, 2002). Gardiner-Garden & Frommer (1987) definiram uma CGI como uma região de 200 pares de bases de DNA com a relação de G+C superior a 50%, e a razão entre CpG observados/esperado ($\text{CpG}^{\text{Obs}} / \text{CpG}^{\text{Exp}}$) maior ou igual a 0,6 (Figura 7).

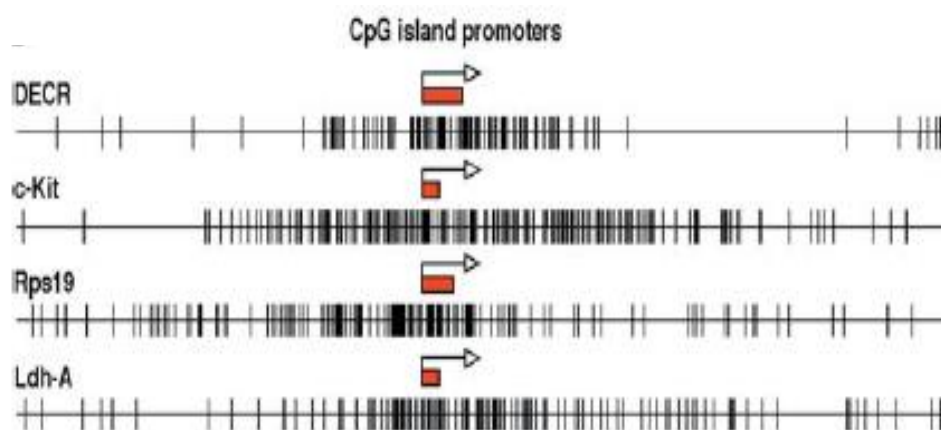


FIGURA 7 – REPRESENTAÇÃO DE ILHAS DE CpG EM PROMOTORES DE GENES. Uma parte contendo a região promotora dos genes *DECR*, *c-Kit*, *Rps19* e *Ldh-A* está representado na figura (à esquerda). Regiões com cerca de 10x mais dinucleotídeos CG (representados pelos riscos verticais) que o resto do genoma são denominadas de ilhas de CpG e estas regiões estão associadas à região promotora dos genes. Setas correspondem à região TSS (*start site transcription*).

Fonte: Antequera, 2003.

A maioria das ilhas de CpG permanecem não metiladas em todos os estágios do desenvolvimento de todos os tipos de tecidos, enquanto os dinucleotídeos CpG presentes ao longo do gene tornam-se metilados (Antequera, 2003). Nos casos em que ocorre metilação da CGI a repressão da transcrição do gene pode ocorrer através da inibição da ligação dos fatores de transcrição ou por mudança na estrutura da cromatina (Bird, 2002). A ordem na qual esses fatos ocorrem pode variar e ainda não foi totalmente elucidada (Dworkin *et al.*, 2009).

A função da metilação do DNA é intrinsecamente ligada aos mecanismos para estabelecer, manter e remover o grupo metil (Jones & Baylin, 2007). O conceito

difundido é que a densidade de metilação da região promotora de um gene, e também, em alguns casos, a metilação no primeiro exon ou intron do mesmo gene podem afetar positiva ou negativamente a transcrição do gene envolvido (Antequera, 2003).

A primeira relação entre a metilação do DNA e o câncer ocorreu em 1983, quando foi demonstrado que o genoma das células tumorais apresentava-se hipometilado em comparação ao das células normais correspondentes (Feinberg & Vogelstein, 1983). Com as modificações encontradas durante a evolução do processo de tumorigênese de alguns genes (Greger *et al.*, 1989; Esteller, 2000) foi possível identificar uma alteração do padrão geral de metilação do DNA.

Enquanto as CGIs localizadas nos promotores dos genes encontram-se frequentemente desmetiladas em células normais, os CpGs localizados ao longo do genoma encontram-se na sua maioria metilados. Durante o estabelecimento neoplásico este padrão se inverte, as CGIs passam a ser hipermetiladas enquanto o corpo do gene (e as regiões intergênicas) passam por um processo de hipometilação global (Esteller, 2000). Estudos têm enfatizado que a posição da metilação na unidade transcricional influencia a sua relação com o controle de genes (Jones, 2012). Por exemplo, a metilação na vizinhança imediata ao TSS (sítio de início de transcrição), mas não no corpo gene, não só não bloqueia como pode até estimular o alongamento da transcrição; enquanto a metilação do corpo do gene pode ter um impacto no mecanismo de processamento do RNA.

1.4.5 Modificações pós-traducionais das histonas

A unidade funcional da cromatina de eucariotos, o nucleossomo, constitui-se de aproximadamente 147 nucleotídeos arranjados em volta de um octâmero de proteínas histonas (McGhee & Felsenfeld, 1980). Na maioria das células, o octâmero é composto dos dímeros H2A, H2B, H3 e H4. Além disso, a histona H1 se liga às regiões entre os nucleossomos e ajuda a estabilizar a estrutura da cromatina (Rivera & Ross, 2013).

A região N-terminal das histonas é passível de sofrer uma variedade de modificações pós-traducionais em diversos resíduos de aminoácidos, principalmente lisinas e argininas (Figura 8). Tais modificações regulam diversos processos celulares, como por exemplo, a transcrição, replicação e reparo do DNA (Kouzarides, 2007).

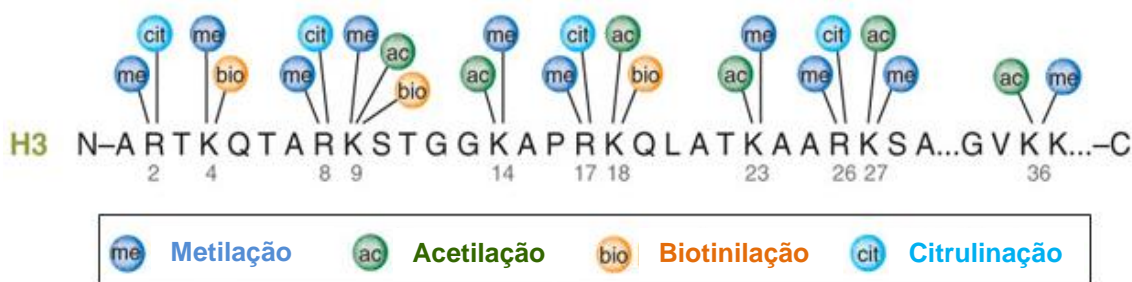


FIGURA 8 - MODIFICAÇÕES PÓS TRADUCIONAIS NA HISTONA H3. Exemplos das possíveis modificações de resíduos específicos da histona H3. As letras correspondem aos aminoácidos presentes na cauda N-terminal (N) da histona H3 e estão numerados em sequência. Os resíduos mais comuns de serem inseridas as modificações são a arginina (R) e lisina (K). No quadro abaixo estão representadas as modificações mais comuns (metilação – azul, acetilação – verde, biotinilação - laranja e citrulinação – turquesa).
Fonte: Adaptado de (Bhaumik *et al.*, 2007).

A nomenclatura para estas modificações (Turner, 2005) identifica, nesta ordem, a histona, o resíduo de aminoácido, a modificação e o nível desta modificação por exemplo H3K9me3 significa trimetilação do resíduo de lisina 9 da histona H3. A maioria dessas marcas são dinâmicas e podem ser estabelecidas e removidas por enzimas em resposta a sinais ambientais e vias intracelulares (Bhaumik *et al.*, 2007; Bannister & Kouzarides, 2011).

As modificações melhor conhecidas são a metilação e acetilação das histonas. Estas modificações são catalisadas pelas histonas metiltransferases (HMTs) e histonas acetiltransferases (HATs), respectivamente. Enquanto as enzimas HATs e HMTs adicionam grupos acetil e metil, as histonas desacetilases (HDACs) e as histonas demetilases (HDMs) removem os grupos acetil e metil, respectivamente (Gronbaek *et al.*, 2007; Haberland *et al.*, 2009). Essas modificações atuam principalmente alterando a conformação da cromatina, liberando ou impedindo o acesso ao DNA para a maquinaria da transcrição (Gronbaek *et al.*, 2007). De um a três grupos metil são capazes de ligar nas lisinas (me1, me2, me3) enquanto a arginina pode receber um ou dois grupos metil (Peterson & Laniel, 2004). De modo bem simplificado, a acetilação das lisinas pode promover o relaxamento da cromatina e ativação transcricional por neutralizar as cargas positivas das histonas (Dion *et al.*, 2005). Enquanto que a metilação têm sido associada tanto para os efeitos de ativação e inibição da transcrição dependendo da quantidade de grupos metil adicionados e de qual lisina recebe a modificação (Teperino *et al.*, 2013). A alternância entre os grupos de modificações inseridos nos diferentes resíduos levaram à

formulação da hipótese de "código de histonas" que afirmam que as combinações específicas destas marcas podem predizer o estado funcional da cromatina (Turner, 2000; Jenuwein & Allis, 2001; Ordog *et al.*, 2012).

Para a maioria das modificações específicas foram atribuídas consequências biológicas que dependem não só do tipo de modificação, mas também de um resíduo particular (Bannister & Kouzarides, 2011). A cromatina é vista sob duas condições sendo a eucromatina acessível à maquinaria da transcrição, sobretudo com 1) marcas de acetilação em diferentes histonas (p.ex., H3K9ac e H4K12ac (Hebbes *et al.*, 1988), 2) marcas de metilação principalmente na H3K4me3 (Bernstein *et al.*, 2002) e 3) presença da variante de H3, a H3.3 (Henikoff *et al.*, 2004; McKittrick *et al.*, 2004). Já a heterocromatina, inacessível à transcrição, por outro lado, é tipicamente associada com marcas repressivas de transcrição (p.ex., H3K27me3, H3K9me3, e H4K12me) (Umlauf *et al.*, 2004; Zhang & Reiberg, 2001).

As modificações pós-traducionais das histonas estão envolvidas em muitos processos biológicos, incluindo o desenvolvimento embrionário (Nakamura *et al.*, 2012; Rivera & Ross, 2013). Um grande número delas também está envolvido nos mecanismos que levam ao câncer (Sandoval & Esteller, 2012). Altos níveis de EZH2, uma proteína *polcomb* que catalisa a metilação de H3K27 têm sido descrita em diversas neoplasias e está associado à malignidade e o grau tumoral em câncer de mama (Doherty *et al.*, 2010). A enzima SUV39H1 catalisa a adição dos grupos metil na H3K9me3 e encontra-se desregulada em diversos tipos de câncer. Em leucemia mielóide aguda, a inibição da SUV39H1 é suficiente para induzir a re-expressão de genes supressores de tumor, tais como *CDKN2B* e *CDH1* pela ausência das marcas de H3K9me3 (Lakshmikuttyamma *et al.*, 2009).

A acetilação das histonas é a modificação mais bem compreendida e foi primeiramente descrita no início dos anos 60 (Phillips, 1963, Allfrey *et al.*, 1964 *apud* Yang & Seto, 2007), mas a natureza química da N-acetilação só foi concluída alguns anos mais tarde (Gershey *et al.*, 1968 *apud* Yang & Seto, 2007). A HAT catalisa a transferência de um grupo acetil oriundo da molécula de acetil-CoA ao grupo ϵ -amino do resíduo de lisina. Com uma molécula de água, a HDAC promove a remoção do grupo acetil da acetil-lisina (Ac-Lys), regenerando o grupo ϵ -amino (Figura 9).

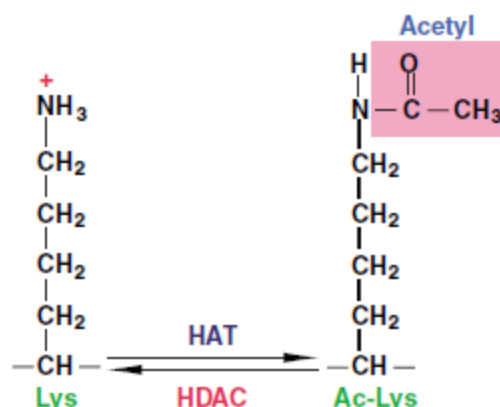


FIGURA 9 - ATUAÇÃO DA HAT E HDAC NA ACETILAÇÃO DE RESÍDUOS DE LISINAS. Ilustração demonstrando a adição e retirada do grupo acetil nos resíduos de lisina efetuado pelas histonas acetil transferases (HAT) e histonas desacetil transferases (HDAC), respectivamente.

Fonte: Adaptado de Yang & Seto, 2007.

Os processos associados à redução da transcrição ou ao fechamento da cromatina estão associados às HDACs. Estas enzimas constituem uma família de 18 membros classificados em quatro grupos (I a IV) baseados nas sequências homólogas (Yang & Seto, 2007). As enzimas de classe I, incluindo as HDAC1, HDAC2, HDAC3 e HDAC8 são proteínas nucleares (Duong *et al.*, 2008). As HDAC de classe II são divididas em duas classes: classe IIa inclui a HDAC4, HDAC5, HDAC7 e HDAC9, enquanto a classe IIb é composta da HDAC6 e HDAC10. As enzimas de classe II têm um padrão tecidual específico de expressão e podem transitar entre o citoplasma e o núcleo dependendo de seu estado de fosforilação. HDAC6 e HDAC10 formam um grupo particular uma vez que elas podem ter dois domínios de acetilase, e porque a HDAC6 pode deacetilar diferentes substratos não histonas (Hubbert *et al.*, 2002). Os inibidores de HDACs (HDI) têm mostrado atividades *in vitro* e *in vivo* em vários tipos de câncer afetando o ciclo celular, a morte celular programada, a diferenciação e angiogênese (Minucci *et al.*, 2006; Bolden *et al.*, 2006).

Nos anos 70, o butirato foi descrito como o primeiro composto não específico inibidor de HDACs, capaz de produzir vários efeitos biológicos em culturas de células (Riggs *et al.*, 1977; Candido *et al.*, 1978 *apud* Yang & Seto, 2007). Na década de 90, um antibiótico fungo estático (Tricostatin A – TSA) foi identificado como o primeiro inibidor específico para HDACs capaz de induzir a diferenciação celular (Yoshida *et al.*, 1990) e tornando-se uma estratégia terapêutica. Outro inibidor, o ácido suberoil

anilida hidroxâmica (SAHA, ou vorinostat - nome comercial) foi identificado com atividade semelhante oito anos após a descoberta do trichostatin (Richon *et al.*, 1998) e aprovado para o tratamento de linfoma de células T (Lemoine & Younes, 2010). O TSA é um HDI amplamente utilizado nas abordagens experimentais. Este composto inibe a ação de HDACs e causa mudanças seletivas em aproximadamente 2% dos genes. As HDAC2, HDAC3 e HDAC8 (classe I) são diretamente reguladas por este composto. O TSA é capaz de inibir a expressão da HDAC7, diminuir as das HDAC2, HDAC8 e HDAC10 e aumentar a expressão da HDAC3 (Duong *et al.*, 2008).

1.4.6. RNAs não codificantes (ncRNA)

Os ncRNA são todas as moléculas de RNA que não são traduzidas em proteínas, mas mostram-se importantes na regulação da transcrição em mamíferos e outros organismos complexos (Mattick & Makunin, 2006). Entre eles, têm-se os RNAs ribossomais (rRNA), RNAs transportadores (tRNA), os grandes RNAs (lncRNA) e os pequenos RNAs regulatórios, os RNAs nucleolares (snoRNA) e os micro-RNAs (miRNA) (Mattick & Makunin, 2006). Os miRNAs são os membros melhor caracterizados e estima-se que eles podem regular de 74 – 92% de todas as proteínas provenientes dos RNAm de um tipo celular (Miranda *et al.*, 2006). Os miRNAs são pequenos, de 18 a 25 nucleotídeos de comprimento, evolutivamente conservados e que atuam como reguladores da expressão de genes envolvidos no desenvolvimento, diferenciação celular, proliferação, sobrevivência e morte (Ambros, 2004). Mais de 1.500 miRNAs foram identificados por análises experimentais e de bioinformática no genoma humano. A especificidade de direcionamento miRNA é definido pela complementaridade entre as posições 2 - 8 a partir da região 5' do miRNA com a região 3' do RNAm alvo (com algumas exceções) (Bartel, 2009). Cada miRNA tem o potencial para atingir entre centenas e milhares de outros genes, ativando ou inibindo a expressão gênica por mecanismos diferentes (Lewis *et al.*, 2003). A expressão desregulada de miRNAs tem sido extensivamente descrita em uma variedade de doenças, inclusive o câncer (Costa *et al.*, 2011). Essas diferenças no padrão de expressão de miRNA sugeriram que os miRNA super expressos poderiam atuar como oncogenes enquanto os miRNAs pouco expressos, como supressores de tumor (Garzon *et al.*, 2010; Girardot *et al.*, 2012). Estas classes de miRNA poderiam servir como biomarcadores na prática clínica através de opções de tratamento adequadas

para cada paciente (Kala *et al.*, 2013) uma vez que o perfil de miRNAs varia nos diferentes tipos de tumor (Costa *et al.*, 2012).

1.5 MARCADORES DE METILAÇÃO DO DNA NO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama, assim como a maioria das neoplasias, é caracterizado pelas modificações genéticas e epigenéticas (Esteller, 2007). Enquanto várias mutações genéticas atuam nos eventos iniciais que predisõem ao câncer de mama, as alterações epigenéticas, tais como a hipometilação ou hipermetilação do DNA ocorrem ao longo da progressão dos processos neoplásicos, nos estágios iniciais ou durante o desenvolvimento de tumores (Kohonen-Corish *et al.*, 2007). Alguns genes comumente hipermetilados em câncer de mama estão envolvidos na evasão à apoptose (*RASSF1*, *HOXA5*, *TWIST1*) e senescência celular (*CCND2*, *CDKN2A*), enquanto outros regulam o reparo do DNA (*BRCA1*), crescimento (*ESR1*, *PGR*) e invasão tecidual (*CDH1*) (Tapia *et al.*, 2008; Dworkin *et al.*, 2009; Jovanovic *et al.*, 2010; Nass *et al.*, 2000; Hsu *et al.*, 2013).

Os genes do receptor de estrógeno (*ESR1*) e progesterona (*PGR*) têm papel fundamental da tumorigênese do câncer de mama. Estes receptores são expressos tanto em tecidos normais quanto em neoplásicos (Liu *et al.*, 2004). A perda de expressão de RP e RE pela inativação da expressão por mecanismos epigenéticos tem um importante papel no contexto da agressividade e recidiva da doença (Liu *et al.*, 2004; Dunnwald *et al.*, 2007). A metilação do gene *PGR* têm sido demonstrada em 40% dos tumores de mama com a ausência deste receptor e em linhagens tumorais RP negativo (Yang *et al.*, 2001). Sabe-se que boa parte das pacientes que adquirem resistência aos tratamentos adjuvantes se dá, em parte, pela inativação de *ESR1* por metilação da sua região promotora. Este dado tem sido descrito para diferentes populações (Gaudet *et al.*, 2009; Mirza *et al.*, 2009). Estudos sugerem que a metilação de *ESR1* constitui um evento frequente nas pacientes e pode auxiliar na progressão da doença (Keen *et al.*, 2004; Ramos *et al.*, 2010; Wei *et al.*, 2012) e que a detecção da condição de metilação de *ESR1*, auxiliado à imunodetecção de RE poderia auxiliar na predição da resposta terapêutica das pacientes com câncer de mama (Ramos *et al.*, 2010; Hervouet *et al.*, 2013).

O gene *CDH1* codifica a glicoproteína transmembrana E-caderina que é importante na manutenção da adesão célula-célula em tecidos epiteliais (Bracke *et*

al., 1996). Alterações na expressão de E-caderina tem sido realizada em vários tipos de câncer e correlacionados com características patológicas, tais como má diferenciação tumoral, crescimento infiltrativo, metástase linfonodal e diminuição da sobrevida do paciente (Hirohashi, 1998). No câncer de mama, a hipermetilação do DNA no promotor do gene *CDH1* é descrita em cerca de 30% dos carcinomas ductais *in situ* enquanto no tumores metastáticos esse valor passa a 60% (Nass *et al.*, 2000). Além disso, esse gene é um dos mais frequentemente inativados por metilação do DNA em câncer de mama (Yoshiura *et al.*, 1995). Estes achados sugerem que a metilação do DNA na região promotora do gene *CDH1* é um evento importante associado com a patogênese do câncer de mama.

1.8 O PROCESSO METASTÁTICO

Em algum momento durante o desenvolvimento da maioria dos tipos de cânceres humanos algumas células do tumor primário podem invadir os tecidos adjacentes e migrar para locais distantes, estabelecendo novas colônias denominadas de metástases (Hanahan & Weinberg, 2000). Do ponto de vista clínico, as metástases são consideradas um dos mais importantes estágios da tumorigênese, uma vez que correspondem a mais de 90% das causas de mortes por câncer (Sporn, 1996; Duffy, 2005; Sethi & Kang, 2011).

As células tumorais que se desprendem do tumor primário tendem a colonizar órgãos específicos, com períodos diferentes de latência e eficiência de colonização (Fidler, 2003; Nguyen & Gill, 2009). Steven Paget, em 1989, formulou a hipótese denominada de a "Semente e o Solo" onde descreve o mecanismo de metástase através de uma analogia em que compara as células tumorais às 'sementes' que são sistematicamente distribuídas mas só habitam ambientes particulares, e os tecidos alvo são comparados aos 'solos' que são favoráveis ao seu contínuo crescimento (Paget, 1989). Paget descrevia apenas que estas células simplesmente cresceriam em novos locais que chegassem ao acaso, limitando-se apenas à anatomia e à sorte. Em busca deste tão complexo mecanismo, estudos vieram estabelecer, na última década, não só que as células tumorais são transportadas pelo sangue mas que o fazem sob a influência dos sinais que determinam seu comportamento migratório. Dois modelos de progressão metastática chamados de paralelo e linear vêm sendo

abordados em câncer de mama e estão discutidos abaixo (Kouros-Mehr *et al.*,2008; Klein *et al.*,2009)

1.6.1 Modelo de Progressão Linear

O Modelo Linear baseia-se na progressão descrita por Leslie Fould (Klein *et al.*,1997) que pressupõe que as células cancerosas passam por várias etapas sucessivas de mutação e seleção (Cairns, 1975 *apud* Klein, 2009) em um novo contexto do tumor primário. Depois de um número significativo de etapas, as células poderiam ser capazes de proliferar relativamente de modo autônomo com uma taxa competitiva de replicação. Resumidamente, neste modelo a malignidade se completaria na ontogenia do microambiente do tumor primário, e somente após isso haveria a disseminação para formação de metástases. Assim, o tumor primário conteria as características moleculares necessárias para tornar-se uma célula capaz de se espalhar por todo o corpo (Klein, 2009).

O modelo linear sugere que o tumor diferenciado poderia se propagar aos locais secundários semelhante a “um chuveiro letal de metástases” (Weinberg, 1989) (Figura 10). Durante a progressão local, as células são selecionadas e a difusão se inicia. Em tumores primários e metástases primárias e secundárias, as células tornam-se cada vez mais malignas até um “chuveiro” final de células metastáticas. O modelo de progressão linear compreende três aspectos chaves empiricamente testados: primeiro a divulgação antes da total malignidade das células, o que – segundo – surgem principalmente em cânceres avançados e, em terceiro, permitem a ocorrência de metástases das metástases.

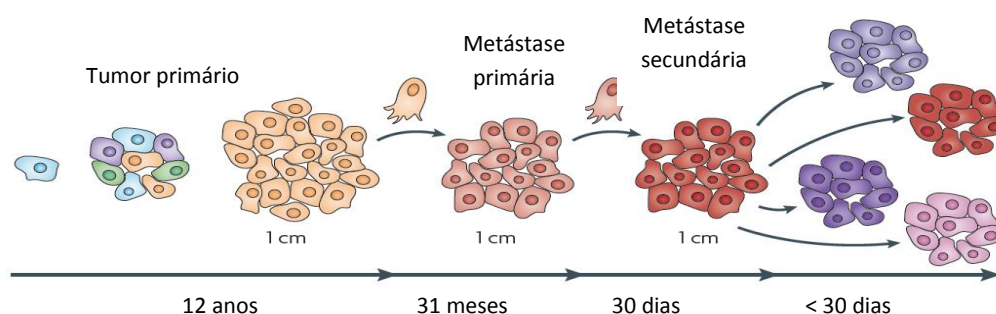


FIGURA 10 - MODELO “CHUVEIRO LETAL DE METÁSTASES”. Este modelo mostra que após o estabelecimento da massa primária em aproximadamente 12 anos do surgimento da primeira célula transformada, cerca de 31 meses para a formação das primeiras metástases (a partir do diagnóstico e após a cirurgia), 30 dias para as metástases secundárias (Klein *et al.*,2006) e menos de 30 dias para espalhar novas células a outros sítios secundários.

Fonte: Adaptado de (Klein *et al.*,2009)

1.6.2 Modelo de Progressão Paralela

O modelo paralelo vem sendo discutido desde a década de 50 em estudos que avaliaram a taxa de crescimento de tumores em humanos (Collins, 1956). Nestes estudos, os autores concluíram que as metástases deveriam ter iniciado muito antes dos primeiros sintomas aparecerem ou antes mesmo do tumor primário ser diagnosticado porque, as metástases eram (ou são) simplesmente muito grandes para serem explicadas pela iniciação em uma fase tardia de desenvolvimento do tumor primário (Collins, 1956; Friberg *et al.*,1997; Klein *et al.*,2009). Resumidamente, as células tumorais partiriam da lesão primária antes da aquisição de fenótipos totalmente malignos para submeter-se a progressão somática e metastática, adquirindo a capacidade de crescerem em um local distante (Klein *et al.*,2009).

Este modelo não questiona os mecanismos gerais de crescimento do câncer, tais como a seleção clonal para a aptidão competitiva em tumores primários, ou o acúmulo das alterações genéticas e epigenéticas. No entanto, a progressão paralela não necessariamente coloca a disseminação de metástases no final do desenvolvimento do tumor primário (Figura 11). Além disso, a disseminação de células tumorais que ainda estão em evolução podem levar a seleção alopátrica e a expansão de células variavelmente adaptadas para microambientes específicos (Klein *et al.*,2009).

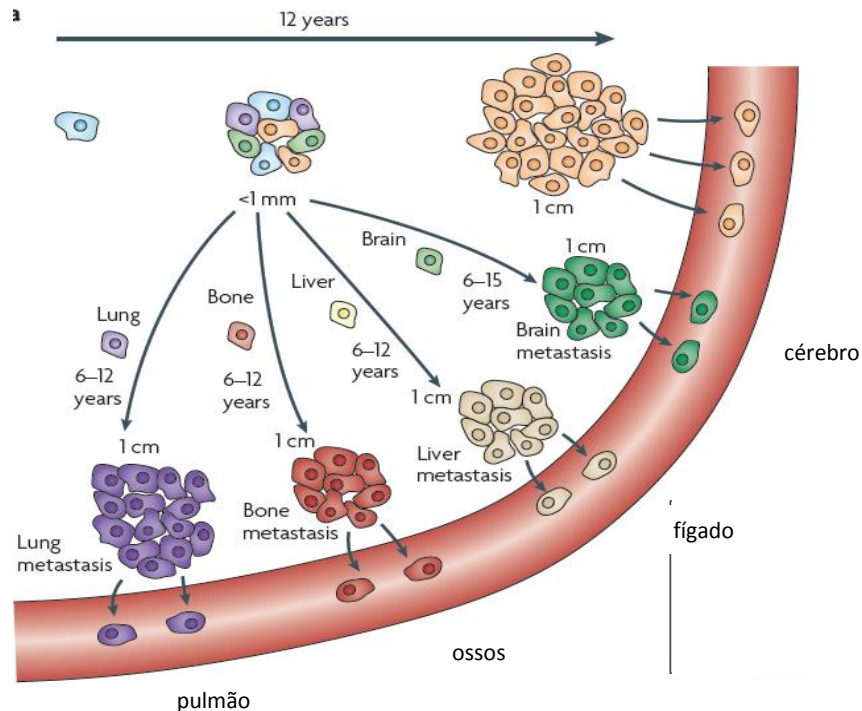


FIGURA 11 - MODELO DE PROGRESSÃO PARALELA. A disseminação de células no modelo paralelo é iniciada quando o diâmetro do tumor atinge de 1-4 mm. Células metastáticas são disseminadas para diferentes órgãos em paralelo ao desenvolvimento do tumor dentro de 6 anos (tempo de duplicação do volume do tumor é duas vezes mais rápido que do tumor primário) e 12 anos (tempo de duplicação do tumor primário igual ao da metástase).
Fonte: Adaptado de Klein *et al.*, 2009.

Comparado ao modelo linear, o modelo de progressão paralela faz três previsões testáveis. O primeiro é o acúmulo independente das alterações genéticas e epigenéticas no tumor primário que diferem em relação ao seu correspondente metastático. A segunda previsão é a implantação das células tumorais em diferentes locais, distantes e em paralelo, independente da adaptação local do tumor primário para então sua disseminação. O terceiro, é a paralela ontogênese de células metastáticas capazes de disseminar do local primário em momentos e quantidades diferentes. Essa característica poderia, por exemplo, explicar porque encontram-se focos metastáticos muito antes do diagnóstico da doença primária ser clinicamente detectável (Klein *et al.*, 2009).

1.7 MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NO MECANISMO DE METÁSTASES

1.7.1 O papel das quimiocinas no processo metastático

Um processo metastático bem sucedido requer duas etapas. Na primeira as células devem responder a sinais quimiotáticos que levam as “sementes” ao “solo” e, segundo, elas devem sobreviver e prosperar à chegada. As quimiocinas são susceptíveis de participar em ambos os processos (Zlotnik *et al.*, 2011). Estas moléculas, também chamadas de citocinas quimiotáticas, são uma família de proteínas de baixo peso molecular (8 – 10 kDa) e sua classificação se dá pela composição de aminoácidos aliados aos resíduos de cisteínas (C), pela sua atividade funcional e pelas propriedades de ligação do receptor. De acordo com isto, são subdivididas em quatro famílias (a) C, (b) CC, (c) CXC e (d) CXXXC, sendo que x representa um aminoácido qualquer.

As quimiocinas participam de processos como a resposta imune, desenvolvimento embrionário, doenças infecciosas e no direcionamento ordenado de células neoplásicas (Muller *et al.*, 2001; Qian *et al.*, 2011).

As células tumorais expressam diferentes receptores de quimiocinas, e que, quando ativados, acionam diferentes sinalizações celulares relacionados à sobrevivência, proliferação, invasão e crescimento de tumores. Estas moléculas podem ser secretadas tanto pelas células tumorais quanto pelas células adjacentes e por isso, as quimiocinas foram uma das primeiras superfamílias que mostraram estar envolvidas na sinalização molecular de metástases. Esta evidência inicial veio a partir da observação de que a expressão de receptores de quimiocinas pelas células tumorais não é aleatória. Muller e colaboradores (2001) mostraram que as células tumorais de mama que passam a super expressar CXCR4 são capazes de migrar através da corrente sanguínea em direção ao seu ligante CXCL12 nos tecidos alvo de metástases (Muller *et al.*, 2001).

O gene *CXCR4* é regulado por mecanismos epigenéticos em carcinoma do endométrio (Kubarek & Jagodzinski, 2007), melanoma (Mori *et al.*, 2005), carcinoma do cólon (Wendt *et al.*, 2006) e pancreático (Sato *et al.*, 2005). Em mama, o papel da epigenética na região 5' do promotor de *CXCR4* (Grochoski, 2008) mostrou que a metilação do DNA existe provavelmente nas células normais para reduzir a expressão de *CXCR4*. Além disso, foi demonstrado que tumores de mama em pacientes que

apresentaram o silenciamento epigenético dos genes *CXCL12* e *ESR1* estão correlacionados com aumento da frequência de aparecimento de metástases e óbito (Ramos *et al.*, 2010) demonstrando a importância destes genes para o prognóstico em câncer de mama.

1.7.2 O papel das Metaloproteases no processo metastático

Um processo essencial na formação de metástases é a degradação da matriz extracelular que permite às células tumorais invadir o tecido local e extravasar para os vasos sanguíneos. Este processo é principalmente influenciado pela atividade de proteinases que são liberadas no local da massa tumoral. Atualmente, pelo menos quatro classes de proteinases são conhecidas: as serina proteinases, proteinases com ácido aspártico, proteinases de cisteínas e as metaloproteases da matriz (MMPs) (Stamenkovic, 2000; Nagase *et al.*, 2006; Page-Mccaw *et al.*, 2007). Coletivamente, essas são as proteinases com capacidade de quebrar todos os componentes da matriz extracelular. Sob condições fisiológicas nos tecidos de remodelamento, na angiogênese, ovulação e cicatrização de feridas há um controle preciso entre a degradação proteolítica e a inibição da proteólise (Garbett *et al.*, 2000; Stamenkovic, 2000; Page-Mccaw *et al.*, 2007). Este importante equilíbrio é interrompido no câncer.

As MMPs são uma família de endopeptidases conhecidas por estarem envolvidas na progressão do câncer através do aumento da motilidade celular, invasão e metástase linfática (Lee *et al.*, 2004). Esta família é constituída por 23 membros, incluindo 17 enzimas solúveis secretadas e 6 metaloproteases presas à membrana (Radisky & Radisky, 2010). Dependendo do substrato em que atuam e da estrutura do seu domínio, as MMPs são divididas em seis subgrupos: collagenases (MMP-1, MMP-8 e MMP-13), gelatinases (MMP-2 e MMP-9), matrilisinas (MMP-7 e MMP-26), estromelisinas (MMP-3, MMP-10 e MMP-11), e MMPs ligadas à membrana MT-MMP (MMP-14 ou MT1-MMP, MMP-15 ou MT2-MMP, MMP-16, MMP-17, MMP-24 e MMP-25) e outras (MMP-12, MMP-19, MMP-20, MMP-21, MMP-23, MMP-27 e MMP-28) (Snoek-Van Beurden & Von Den Hoff, 2005; Fanjul-Fernandez *et al.*, 2010). Embora as MMPs sejam classificadas com base na sua afinidade por determinado substrato, algumas se sobrepõem, caracterizando uma promiscuidade funcional. Todas as MMPs apresentam algumas características em comum, tais como 1) um domínio catalítico, com um átomo de Zn^{+2} no sítio ativo; 2) um domínio pró-peptídico, essencial para a manutenção de sua latência enzimática, e que é removido quando a

enzima é ativada (Fridman *et al.*, 1992), e 3) um domínio contendo um peptídeo sinal que direciona o produto para secreção (Figura 12).

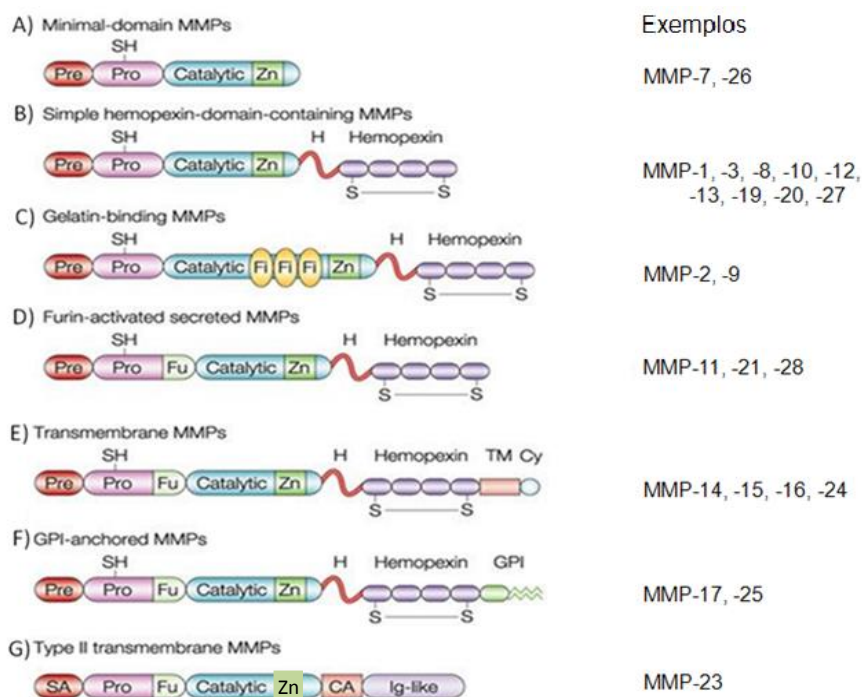


FIGURA 12 – CLASSES DAS METALOPROTEASES. **A)** MMP com domínios contendo uma sequência sinal N-terminal (Pre), um propeptídeo (Pro) com interação (SH) ao zinco (Zn) do sítio ativo. **B)** Presença do domínio homólogo à hemopexina conectada aos domínios mínimos por uma dobra, representada por H. A primeira e última das quatro repetições neste domínio são unidos por ligação dissulfeto (S-S). **C)** MMPs de ligação à gelatina contendo domínios que se parecem com repetições de fibronectina (Fi). **D)** MMPs ativadas pela furina contendo uma região semelhante à furina (Fu) entre seus propeptídeos e domínios catalíticos presentes também nas MMPs acopladas a membrana (MT-MMPs) (**E** e **F**). As MT-MMPs incluem as MMPs com domínio transmembrana (TM) (**E**), as MMPs ancoradas ao domínio glicosil fosfatidil inositol (GPI) (**F**) e o domínio transmembrana tipo II, com sinal âncora (CA) de ligação à membrana (**G**).

Fonte: Adaptado de Egeblad & Werb, 2002.

As gelatinases A e B (MMPs 2 e 9) diferem das demais por apresentarem um domínio semelhante à fibronectina separando o domínio catalítico do semelhante à hemopexina.

Com exceção da MMP-11, as MMPs são secretadas como zimogênios e ativadas fora da célula por outras MMPs ativadas ou por proteases de serina (por exemplo, tripsina, plasmina, calicreína) enquanto as MT-MMPs são ativadas intracelularmente (Curran *et al.*, 2004; Nagase *et al.*, 2006). Para sua ativação é necessária a remoção do domínio pró-peptídico que permite o acesso ao sítio

catalítico das MMPs. O direcionamento de vários membros da família das MMP para a região pericelular, quer por uma ligação direta na membrana ou em receptores, ou ainda por meio de interações com proteínas na superfície celular (i.e. integrinas), cria uma região de atividade proteolítica concentrada que é capaz de promover a invasão tecidual, atuar como um sinalizador para o crescimento interferindo nas interações das células e a matriz (Welm *et al.*, 2002).

Coletivamente, as MMPs também podem contribuir para a fisiologia de células tumorais *in vivo* em virtude da sua capacidade de clivar fatores de crescimento, receptores de superfície celular, moléculas de adesão e sinalizar às quimiocinas (Jezierska & Motyl, 2009). As MMPs são super expressas em quase todos os tipos de câncer e esta característica é muitas vezes associada a um pior prognóstico para os pacientes (Forget *et al.*, 1999; Curran *et al.*, 2004). Ao mesmo tempo que as MMPs são produzidas pelo epitélio maligno, também são secretadas pelo estroma adjacente (Singer *et al.*, 2002; DeClerck *et al.*, 2004) e autores descrevem que o aumento da quantidade de MMPs constituem nada mais que uma resposta do hospedeiro induzida pelo tumor (Coussens *et al.*, 2002).

A atividade das MMPs pode ser regulada por distintas classes de proteínas, incluindo os inibidores teciduais das metaloproteases (TIMPs) e a α -2-macroglobulina (Duffy *et al.*, 2000; Sternlicht *et al.*, 2001; Hu *et al.*, 2007), proteínas ativadoras do fragmento carboxi terminal do pró-colágeno (CT-PCPE) (Mott *et al.*, 2000), pelo fator tecidual inibitório-2 (TFPI-2) (Herman *et al.*, 2001), pelo domínio NC1 do colágeno IV (Netzer *et al.*, 1998) e pela glicoproteína de membrana RECK (*Reversion inducing Cystein rich protein* – motif Kazal) (Takahashi *et al.*, 1998; Oh *et al.*, 2001). Exceto pela proteína RECK (ver mais detalhes no item 1.7.4), os demais inibidores são secretados e estão localizados na matriz e/ou circulantes no sangue (Welm *et al.*, 2002).

Existem quatro moléculas TIMPs identificadas que inibem as MMPs de forma seletiva em concentrações de 1:1 (Chang & Werb, 2001), e o emparelhamento correto de seis resíduos de cisteína na região amino terminal conferem seu caráter seletivo sobre qual MMP vai ocorrer a interação (Gomez *et al.*, 1997). Individualmente, a TIMP-1 inibe a collagenase, estromelisina-1 e as formas ativas e inativas de MMP-9. A TIMP-2 inibe a forma pró-MMP-2, ao mesmo tempo que a ativa quando MMP-14 está presente. A TIMP-3 está associada com a MEC e inibe a secreção das pró-MMP-2 e 9 e a TIMP-4 é responsável por inibir a pró-MMP-2 (Baker *et al.*, 2002, Bernardo & Fridman, 2003). Trabalhos mostrando a utilização de inibidores de MMPs na tentativa

de contenção e/ou prevenção de metástases em pacientes neoplásicos, tais como batimastat, marimastat ou ilomastat não mostraram resultados satisfatórios, isto talvez, devido à infinidade de funções que as MMPs coordenam (Fassina *et al.*, 2000, Munshi *et al.*, 2004).

1.7.3 Gelatinase A, Metaloprotease-2 ou MMP-2

O gene *MMP2* localiza-se no cromossomo 16q13-q21 e teve sua estrutura completa determinada em 1990 (Huhtala *et al.*, 1990). O gene possui 31017 pb e 13 éxons. Possui a variante transcricional (VT) 1 (NM_004530.4) que produz um transcrito de 3548 pb e a VT 2 (NM_001127891.1) que produz um transcrito de 3402 pb. Estas são sintetizadas como pré-proteínas nos ribossomos e direcionadas ao retículo endoplasmático, onde perdem seu domínio sinal (pré-domínio). A proteína MMP-2 é liberada das células na forma de zimogênio (pró-MMP-2, com 72 kDa) necessitando da clivagem pós-traducional extracelular para ganho de atividade biológica. Sua forma ativa possui 62 kDa (Roberts *et al.*, 2002).

A região promotora de *MMP2* possui diversos elementos regulatórios, dentre eles, o ativador de proteínas AP2, um sítio de ligação poliomavírus proteína-3-(PEA3) e não possui a região de ligação TATA (Overall & Otín, 2002, Fanjul-Fernandez *et al.*, 2010) (Figura 13).



FIGURA 13 - ELEMENTOS REGULATÓRIOS NA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *MMP2*

HUMANO. O sítio de início de transcrição de *MMP2* está indicado pela seta e os elementos regulatórios (p53 – proteína p53, AP2 – ativador de proteínas 2, PEA3 – poliomavírus proteína-3, CREB – proteína de resposta à ligação do cAMP, GC – sítios GC box) dentro das formas coloridas em ordem, na região promotora do gene.

Fonte: Fanjul-Fernandez *et al.*, 2010.

Na sequência promotora de *MMP2* foram identificados três polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs). Dois deles são as transições C para T localizados em -735 e -1306, que impedem a ligação do fator de transcrição SP1, e estão associados com a diminuição da atividade do promotor (Fanjul-Fernandez *et al.*, 2010). Tem sido relatado o alto risco de desenvolver câncer de pulmão, esôfago e de cabeça e pescoço em indivíduos com o haplótipo -1.306/-735 CC, sugerindo um papel protetor dos haplótipos TT (-1.306/-735) (Yu *et al.*, 2004; Wang & Cai, 2012; Zhang *et al.*, 2013). O terceiro SNP encontrado no promotor de *MMP2* é uma transição de G para A na

posição -1576, que impede a ligação do receptor de estrógeno e também resulta na diminuição da atividade de transcrição (Harendza *et al.*, 2003). No entanto, em estudos de meta análises não há nenhuma evidência da associação de polimorfismos de *MMP2* e o risco de metástases em pacientes com câncer de mama (Liu *et al.*, 2012).

A MMP-2 contribui para a invasão tumoral e metástase pela degradação do colágeno tipo IV, o componente mais abundante da membrana basal e responsável por separar as células epiteliais do estroma (Duffy *et al.*, 2000). Sua ação é co-dependente da MT1-MMP, também conhecida como MMP-14, a primeira MMP identificada (Cao *et al.*, 1995). O gene *MMP14* está localizado no cromossomo 14q11-q12 e possui 11161 pb e 10 éxons. Sua VT de 3558 pb (NM_004995) está relacionada à degradação das proteínas da matriz extracelular e ativação de outras MMPs, tais como pró-MMP-2, pró-MMP-13 e pró-MMP-8 (Hotary *et al.*, 2003; Sabeh *et al.*, 2004; Barbolina & Stack, 2008). A co-expressão de MMP-14 e MMP-2 foi correlacionada com invasão e metástase de melanoma em xeno-enxerto em modelos humanos (Hofmann *et al.*, 2000) e com o potencial invasor em câncer de próstata (Wilson *et al.*, 2004). Estas duas MMPs apresentam-se desreguladas mesmo em estágios iniciais de carcinomas mamários altamente invasivos. Os carcinomas metastáticos foram associados com aumento da expressão de MMP-14, MMP-2 e também da MMP-9 (Figueira *et al.*, 2009) fazendo com que estas moléculas sejam propostas como biomarcadores para a agressividade e invasividade do tumor e pior prognóstico aos pacientes (Jiang *et al.*, 2006; Figueira *et al.*, 2009; Kohrmann *et al.*, 2009; Al-Raawi *et al.*, 2011).

1.7.4 Os processos de regulação da MMP-2

A secreção e ativação da proteína MMP-2 é regulada por meio da formação de um complexo molecular entre MT1-MMP e TIMP-2 (Lee *et al.*, 2004; Barbolina & Stack, 2008) com interferência direta da RECK (Welm *et al.*, 2002). Embora as TIMPs tenham ação inibitória da atividade das MMPs, a TIMP-2 auxilia na ativação da MMP-2 (Figura 14). A TIMP-2 atua como um inibidor de MMP através do seu domínio amino-terminal ligando-se à MT1-MMP, e como um ativador de MMP, através do seu domínio carboxi-terminal, que recruta a pró-MMP-2 para formar um complexo ternário que resulta na ativação de MMP-2 (Deryugina *et al.*, 2001).

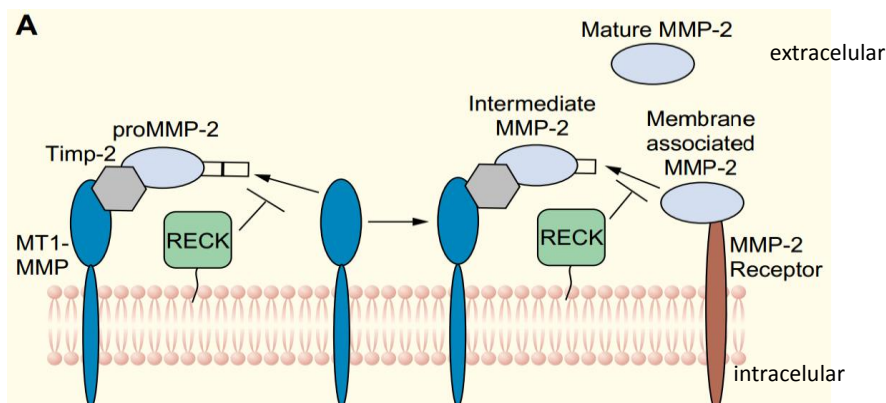


FIGURA 14 – REGULAÇÃO DA ATIVIDADE DE MMP-2 VIA PROTEÍNA RECK. A MT1-MMP (ou MMP14) está envolvida no processamento da pró-MMP-2. Durante este processo, a TIMP-2 promove a interação de MT1-MMP com a pró-MMP-2. Outra molécula de MT1-MMP cliva uma porção do pró-domínio de MMP-2 formando uma proteína de MMP-2 intermediária. Uma clivagem adicional do pró-domínio de MMP-2 pode resultar na maturação final e liberação de MMP-2 madura para a superfície da célula. Ambos os processos podem ser inibidos pela RECK.

Fonte: Welm *et al.*, 2002.

A interferência da proteína RECK neste processo pode estar relacionada à sua posição. Sua atividade proteolítica pode potencializar a ação inibitória sobre MMP-2 uma vez que a ancoragem via glicosil fosfatidil inositol (GPI) de RECK pode destiná-la a diferentes regiões celulares, posicionando-a em locais críticos envolvidos na sinalização celular (Welm *et al.*, 2002). Durante a transformação celular, a expressão do gene *RECK* é inibida, resultando na secreção e atividade aumentada de metaloproteases, que contribuem para a transformação morfológica e o comportamento invasivo das células tumorais (Takahashi *et al.*, 1998).

Um dos mecanismos relatados à ação de MMP-2 em ensaios com tumores descrevem a interação entre esta MMP e as integrinas, especialmente entre as subunidades $\alpha v \beta 3$ e $\alpha 5 \beta 1$ (López-Otin & Overall, 2002). As integrinas constituem uma família de receptores de superfície celular, localizados na região transmembrana e que participam da interação célula vs célula e célula vs MEC. Existem aproximadamente 20 diferentes proteínas sinalizadoras que podem cooperadamente associar-se às unidades α e β das integrinas, iniciando cascatas de sinalização que estão envolvidas na diferenciação celular, adesão, migração, invasão, proliferação, angiogênese e sobrevivência (Miyamoto *et al.*, 1995; Van der Flier *et al.*, 2001). A adesão intermediada pela ligação com integrinas leva ao rearranjo do citoesqueleto e regula vias da cascata sinalizadora Ras/Raf/MEK/ERK. O ERK citoplasmático é fosforilado, transferido para o núcleo e desfosforilado, e reenviado para o citoplasma.

O fosfoinositol-3-kinase (PI3K) pode se ligar ao FAK fosforilado, ou é ativado diretamente pela ligação de integrinas (Khwaja *et al.*, 1997) e isto é visto como um evento chave na mobilidade e adesão celular (Juliano, 2002).

A fibronectina (FN) é uma glicoproteína dimérica de alto peso molecular (450 – 500 kDa) que contém um número discreto de sítios de ligação para moléculas da MEC, tais como fibrina, heparina, colágeno e receptores de integrina (Hynes, 1990) (Figura 15). Devido a estas interações, a fibronectina desempenha muitas funções biológicas incluindo a integridade estrutural da MEC, a ligação entre as células, migração, controle da morfologia e diferenciação celular (Steffensen *et al.*, 2002). A FN é constituída por repetições homólogas dos tipos I, II e III com aproximadamente 40, 60 e 90 aminoácidos respectivamente (Skorstengaard *et al.*, 1986 *apud* Steffensen *et al.*, 2002). A região adesiva na porção central da fibronectina compreende pelo menos duas sequências de aminoácidos: 1) Arg-Gly-Asp (RGD) e 2) Pro-His-Ser-Arg-Asn (PHSRN) possuindo função sinérgica. O arranjo entre as células e a fibronectina inicialmente é mediada pela interação entre o $\alpha 5 \beta 1$ receptor de integrina, que interage com a região central da fibronectina e requer ambos os sítios (RGD e PHSRN) para uma forte ligação (Akiyama *et al.*, 1995).

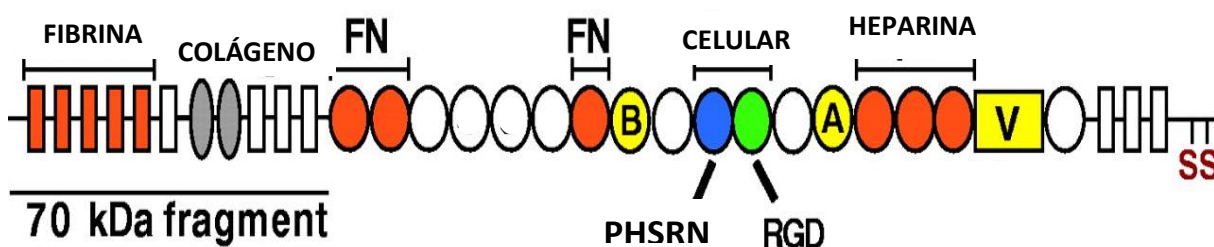


FIGURA 15 – ESTRUTURA DA FIBRONECTINA E SEUS SÍTIOS DE LIGAÇÕES. A fibronectina é uma glicoproteína composta de três módulos – I (retângulo – laranjas e brancos), II (ovais - cinza) e III (círculos – brancos, laranjas, amarelo, azul e verde) que se ligam diferencialmente à outras moléculas (fibrina, colágeno, fibronectina, celular por meio de integrinas, heparina) descritas acima da figura. Os três segmentos de transcrição alternativa B, A e V estão sinalizados em amarelo na figura. Os sítios PHSRN e RGD estão demonstrados na figura. SS correspondem às pontes dissulfeto (S-S).

Fonte: Wierzbicka & Schwarzbauer, 2003.

Nas gelatinases (MMP-2 e 9) estão presentes três módulos semelhantes à porção II da fibronectina, que formam um domínio de ligação ao colágeno e que contribui para a ligação simultânea de duas moléculas de colágeno (Steffensen *et al.*, 1995). Sabe-se de acordo com a literatura, que a MMP-2 é ativada pela atuação direta entre a célula tumoral e a fibronectina. Estudos envolvendo células de câncer

de ovário e de mama mostraram que, uma vez estimulada pela presença de fibronectina, a célula tumoral é capaz de promover a transcrição de *MMP2*, que por sua vez, cliva a fibronectina e promove a interação entre as integrinas às células adjacentes (Kenny *et al.*, 2008; Das *et al.*, 2008).

2 JUSTIFICATIVA

Apesar dos avanços no diagnóstico, prevenção e tratamento das pacientes com câncer de mama, a taxa de mortalidade dessas mulheres permanece ainda muito elevada. Diante desta perspectiva, novos marcadores são necessários para auxiliar no diagnóstico, prognóstico e prevenção desta doença.

Neste trabalho propôs-se a avaliação de genes que poderiam auxiliar no entendimento da complexidade que envolve o mecanismo de metástase no câncer de mama. Dados prévios envolvendo o gene *CXCR4* (Grochoski, 2008) foram analisados estatisticamente em conjunto com dados dos genes *CXCL12* e *ESR1* (Ramos, *et al.*, 2010) e foi possível observar correlação entre a metilação do DNA na região promotora destes genes e o processo metastático. Deste modo, o primeiro artigo deste trabalho foi reavaliar os resultados entre os genes *CXCR4* e *CXCL12* nas amostras tumorais, levando-se em consideração o seguimento das pacientes. As mudanças epigenéticas que ocorrem nos promotores dos genes *CXCR4* e *CXCL12*, os objetivos e resultados desse estudo podem ser vistos a seguir no artigo publicado (Ramos *et al.*, 2011).

Além das quimiocinas e o seu papel crucial no direcionamento das metástases em câncer de mama, diversos trabalhos também têm demonstrado a importância das metaloproteases e sua participação na progressão e estabelecimento do foco metastático. Iniciou-se então, um estudo envolvendo o processo de regulação epigenética no gene *MMP2*. Este gene deu início a uma dissertação de mestrado em 2008 (Silva, 2010) em virtude de (1) possuir ilhas de CpG na sua região promotora e (2) uma expressão diferenciada entre as linhagens tumorais de mama testadas. O papel da epigenética na regulação da expressão desse gene ainda não havia sido descrito. No decorrer do trabalho de Silva (2010) houve a publicação de um artigo que mostrava que o gene *MMP2* era regulado por mecanismos epigenéticos em câncer de mama através da análise da linhagem tumoral de mama MCF7 e de linhagem tumoral de glioblastoma (Chernov *et al.*, 2009). Embora Chernov *et al.*, (2009) tenha utilizado iniciadores para a reação de MSP (*methylation specific PCR*) em sua análise, nenhuma amostra tumoral foi utilizada, importante para validar a hipermetilação do promotor de *MMP2* como marcador molecular do câncer de mama. Portanto, Silva iniciou um trabalho utilizando imunohistoquímica de MMP-2 com 18 amostras de tumores primários que foram comparados com os resultados de MSP de amostras

tumorais utilizando os iniciadores já descritos (Chernov *et al.*, 2009). Porém, os resultados obtidos a partir do perfil de metilação das amostras de tumores não correspondiam aos resultados obtidos pela técnica de imunohistoquímica. Ou seja, os tumores que eram metilados apresentavam a expressão da proteína (Silva, 2010). Como o trabalho de Chernov e colaboradores (2009) empregou apenas uma linhagem de mama (MCF7), acredita-se que mais linhagens de mama deveriam ser analisadas para a extrapolação dos dados para as amostras tumorais. Sendo assim, neste trabalho de doutorado, o segundo objetivo foi dar continuidade ao trabalho de mestrado (Silva, 2010) clonando e sequenciando a ilha de CpG do gene *MMP2* de diferentes linhagens tumorais de mama, caracterizando seu perfil de metilação. Além disso, o número de amostras de tumores para a análise de imunohistoquímica foi ampliado para 44 para dar mais confiabilidade aos resultados.

Além destes genes descritos, o gene do receptor de progesterona (*PGR*) também sofre hipermetilação e silenciamento (Leu *et al.*, 2004) semelhante ao o que ocorre com o gene *ESR1* em carcinoma de mama. Sendo assim, foi feito o estudo o perfil de metilação dos genes *MMP2*, *PGR* e *ESR1* por MSP e imunohistoquímica. Esses dados estão descritos a seguir no formato no qual será submetido para publicação.

Sabe-se que a proteína fibronectina em cultura atua como um ativador de MMPs em diversos tipos de células tumorais. Por outro lado, o gene *MMP2* é comprovadamente regulado por metilação do DNA e modificação das histonas. Portanto, para o terceiro artigo, foi avaliado na linhagem MCF7, se a indução da expressão de *MMP2* por fibronectina poderia ter envolvimento epigenético.

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

♦ Caracterizar o perfil de metilação de promotores de genes envolvidos com a sinalização – *CXCL12* e *CXCR4*, a proliferação celular– *PGR* e *ESR1*, e a migração celular - *MMP2*, durante o processo metastático em câncer de mama e correlacionar com os fatores de prognósticos.

3.2 ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a hipermetilação do promotor do gene *CXCR4* em conjunto com os dados já disponíveis do gene *CXCL12*, correlacionando com os parâmetros clínico-patológicos de pacientes com câncer de mama.
- ✓ Avaliar o perfil de metilação do DNA dos genes *MMP2*, *ESR1* e *PGR* e compará-lo com os dados de imunohistoquímica e parâmetros clínico-patológicos de pacientes com câncer de mama.
- ✓ Avaliar a hipermetilação do promotor de *MMP2* em linhagens tumorais de mama.
- ✓ Comparar a expressão de *MMP2* a partir da interação em cultura celular da linhagem MCF7 com a fibronectina e com os agentes desmetilante (5-aza-2' - deoxicitidina) e inibidor de HDACs (Tricostatin A).
- ✓ Caracterizar o perfil de metilação da cada tratamento através da clonagem e sequenciamento da região promotora do gene *MMP2* na linhagem MCF7.
- ✓ Avaliar a marcação de histonas na região promotora de *MMP2* a partir do tratamento com fibronectina, comparar com o controle e avaliar alguns dos códigos que compõem esta interação.

Separata 1

Epigenetic Changes of CXCR4 and its Ligand CXCL12 as Prognostic Factors for Sporadic Breast Cancer

ARTIGO PUBLICADO: Alterações epigenéticas de *CXCR4* e o seu ligante *CXCL12* como fatores prognósticos para o câncer de mama esporádico
Revista PloSOne. Dezembro 2011, vol. 6 número 12. (JCR 4.11)

O receptor de quimiocinas *CXCR4* desencadeia seus efeitos biológicos através da interação com a quimiocina ligante, *CXCL12* (fator derivado de célula de estroma-1, SDF-1) e ambos são expressos tanto pelas células tumorais, quanto pelas células do estroma tumoral. A interação *CXCR4*-*CXCL12* ativa vias de sinalização intracelulares que desencadeiam inúmeros efeitos biológicos, como sobrevivência, proliferação e invasão celular, contribuindo com o desenvolvimento do câncer. O gene *CXCR4* é super-expresso em vários tipos de câncer, inclusive de pulmão, pâncreas, cérebro e mama. No câncer de pâncreas e melanoma, a expressão do gene *CXCR4* é regulado pela metilação do DNA na sua região promotora. Sendo assim, o objetivo geral deste projeto foi avaliar a participação da metilação do DNA no controle da expressão do gene *CXCR4* em linhagens tumorais de mama para posterior correlação com aspectos clínico-patológicos de tumores primários de mama. Para isso, foi avaliada a expressão do gene *CXCR4* por RT-PCR. As linhagens PMC42, MCF7 e MDA-MB-436 apresentaram super expressão do gene enquanto a linhagem MDA-MB-435 apenas expressou este gene após tratamento com agente desmetilante 5'-aza-2'-deoxicitidina. Um fragmento de 184 pb da ilha de CpG 2 presente na região promotora do gene *CXCR4* foi clonada nestas linhagens após tratamento do DNA com reagente bissulfito de sódio. Análises de sequenciamento mostraram que as linhagens que super expressaram o *CXCR4* apresentaram uma densidade de metilação de 15%; enquanto a linhagem que não expressou o *CXCR4* possui valores de metilação de 91%. Dados de MSP mostraram que a ausência de metilação do DNA na região promotora de *CXCR4* foi detectada em 67% das amostras de tumores de mama analisados. Esta condição foi associada com o estágio do tumor, tamanho, grau histológico, comprometimento de linfonodos, metilação de *ESR1* e *CXCL12*, metástase e morte das pacientes. Análises de sobrevida demonstraram que pacientes com o promotor de *CXCR4* não metilado tiveram uma pior sobrevida global (OS) e sobrevida livre de doença (DFS). Além disso, as pacientes que apresentavam simultaneamente os genes *CXCL12* metilado e *CXCR4* não metilado apresentaram menor OS e DFS. Os resultados deste trabalho demonstraram que a avaliação da condição de metilação dos genes *CXCR4* e *CXCL12* poderia ser utilizado como biomarcadores de prognóstico em câncer de mama.

Separata 2

***MMP-2* positive protein and *ESR1* and *PGR* methylated promoter genes as markers of worse prognosis in breast cancer.**

ARTIGO EM SUBMISSÃO: *A presença da proteína MMP-2 e a metilação da região promotora dos genes *ESR1* and *PGR* constituem pior prognóstico à pacientes com câncer de mama.*

Submissão para Revista PLoS One

O câncer de mama é a principal causa de mortalidade relacionada ao câncer em mulheres no mundo ocidental. Aproximadamente 90% das taxas de morte relacionadas ao câncer são por causa das metástases. Metaloproteases de matriz, tais como a MMP-2, estão diretamente envolvidas na migração de células tumorais. Devido a sua função de degradação do maior constituinte do microambiente tumoral, o colágeno tipo IV, sugere-se que a presença da proteína MMP-2 em tumores poderia ser considerada um marcador molecular para a metástase em vários tipos de câncer, incluindo o de mama. No câncer de mama existem dois principais marcadores moleculares bem estabelecidos: o receptor de estrógeno (RE), transcrito pelo *ESR1* e o receptor de progesterona (PR), transcrito pelo *PGR*. Ambos os receptores estão diretamente envolvidos no desenvolvimento do câncer e sua progressão, bem como ao tratamento hormonal amplamente realizado. Os genes *MMP2*, *ESR1* e *PGR* são regulados por mecanismos epigenéticos, tais como a hipermetilação do DNA. A inativação dos genes *ESR1* e *PGR* por hipermetilação da região promotora está associado com a resistência à terapia hormonal pelas pacientes contribuindo para um pior prognóstico. Neste estudo, avaliou-se o silenciamento por metilação do DNA dos genes *MMP2*, *ESR1* e *PGR* e a presença de proteína por imunohistoquímica. A presença da proteína MMP-2 e a metilação dos genes dos receptores hormonais mostraram-se marcas importantes na sobrevida global e sobrevida livre de doença. A avaliação de MMP-2 junto aos marcadores já empregados na prática clínica poderia auxiliar no prognóstico da doença, bem como traçar estratégias terapêuticas para evitar a resistência à terapia hormonal.

Separata 3

**Fibronectin induces *MMP2* promoter gene demethylation in MCF7
Breast Cancer Cell**

ARTIGO EM PREPARAÇÃO: Fibronectin induces *MMP2* promoter gene demethylation in MCF7 Breast Cancer Cell

O câncer de mama é o tipo mais frequentemente diagnosticado nas mulheres de todo o mundo e as metástases constituem a principal causa de morte. Alterações na regulação da expressão gênica por eventos epigenéticos são mecanismos comuns em câncer de mama. Interação entre células tumorais e da matriz extracelular (MEC) interferem no desenvolvimento tumoral, afetando a sobrevivência da célula, proliferação e migração. As metaloproteinases de matriz (MMPs) são proteases dependentes de zinco que têm a capacidade de degradar as proteínas da matriz extracelular e tem sido associadas com malignidade em muitos tipos de câncer. A enzima MMP-2 é um importante mediador bem conhecido no estudo de metástase, uma vez que é capaz de degradar o colágeno tipo IV, o principal constituinte das membranas basais. A interação entre células tumorais e a fibronectina, uma molécula constituinte da matriz foi capaz de promover a expressão de *MMP2*. Sabendo-se que o gene *MMP2* é epigeneticamente regulado no câncer de mama o objetivo deste trabalho foi avaliar se a interação da célula tumoral de mama e a fibronectina atuaria na regulação epigenética do promotor de *MMP2*. A linhagem MCF7 foi submetida ao tratamento com 5-aza-2'-deoxicitidina (5-Aza), Tricostatin A (TSA) e cultivada com fibronectina por 3 e 5h. Dados de expressão mostraram que a linhagem MCF7, que não expressa o gene *MMP2* passou a expressá-lo em todas as condições avaliadas. Ensaio de zimografia mostrou que todas as condições avaliadas foram capazes de produzir formas ativas da proteína. O sequenciamento da ilha de CpG 2 na região promotora de *MMP2* mostrou que, embora haja expressão do gene, os cultivos com 5-Aza e TSA, e em ambos não produziram alterações drásticas na taxa de metilação global, que diminuíram aproximadamente 5%. No entanto, a linhagem MCF7 quando cultivada com fibronectina durante 5h apresentou uma desmetilação de 30%. Embora ocorra expressão de MMP-2, ensaios de migração e invasão não mostraram alteração no padrão migratório da MCF7. Quando as células foram estimuladas com fibronectina por 5h, e em seguida desestimuladas e cultivadas nas condições usuais por 48h, resultados de expressão e sequenciamento mostraram que há um processo de metilação dos CpGs outrora desmetilados. Ensaio de imunoprecipitação da cromatina com os anticorpos H3K9me3, H3K27me3 e H3K4me3 da linhagem controle e da cultivada com fibronectina não mostraram alterações significativas, mas observa-se uma tendência no aumento das marcas de trimetilação de H3K4 que indicam abertura da cromatina para transcrição. Estes resultados constituem a primeira evidência de que a fibronectina foi capaz de induzir a desmetilação da região promotora de *MMP2*, e que esta sinalização precede as modificações das histonas na regulação do gene no processo reversível de transição epitelial mesenquimal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL BIOLÓGICO

As linhagens celulares utilizadas nessa tese foram cedidas pelo Instituto Ludwig de pesquisa para o câncer - SP e são provenientes de diferentes tipos anatomopatológicos de tumores de mama: PMC42, SKBR3, MDA-MB-436, MDA-MB 231, MDA-MB 435 e MCF7 e as linhagens de epitélio ductal mamário imortalizadas por SV40 HB4a e HB4aC3.6 (Stamps *et al.*, 1996). Os cultivos das linhagens foram realizados em meio RPMI 1640 (Gibco) suplementado com soro fetal bovino (SFB) (Gibco) 10%, 2 mM de glutamina e gamicina 40 µg/mL, seguindo o protocolo sugerido pela ATCC.

4.2 CLONAGEM E SEQUENCIAMENTO DA ILHA DE CpG 2 DO GENE *MMP2*

4.2.1 Extração de DNA

A extração do DNA genômico das linhagens foi realizada utilizando a técnica com fenol/clorofórmio (Sambrook & Russel, 2001). A linhagem MCF7 foi submetida a diferentes tratamentos de cultivo e em alguns experimentos foi utilizado os reagente de extração de RNA e DNA simultâneos *AllPrep* RNA/DNA (Qiagen) com o qual se obtém melhor rendimento das moléculas de estudo.

4.2.2 Tratamento de DNA com Bissulfito de Sódio

As amostras de DNA foram quantificadas no espectrofotômetro *Nanodrop 2000* e aproximadamente 1 µg foi utilizado para o tratamento com bissulfito de sódio utilizando o protocolo *Epitect* (Qiagen), de acordo com as especificações do fabricante. Para avaliar a eficácia da técnica no tratamento do DNA, foram realizadas uma reação de *nested*-PCR para a sequência satélite SATR-1 (Costa *et al.*, 2006). Para a reação *nested*, que consiste de duas reações com diferentes condições de adstringência, foram utilizados os iniciadores (HIPO-2) e as condições descritos na Tabela 1 (anexo).

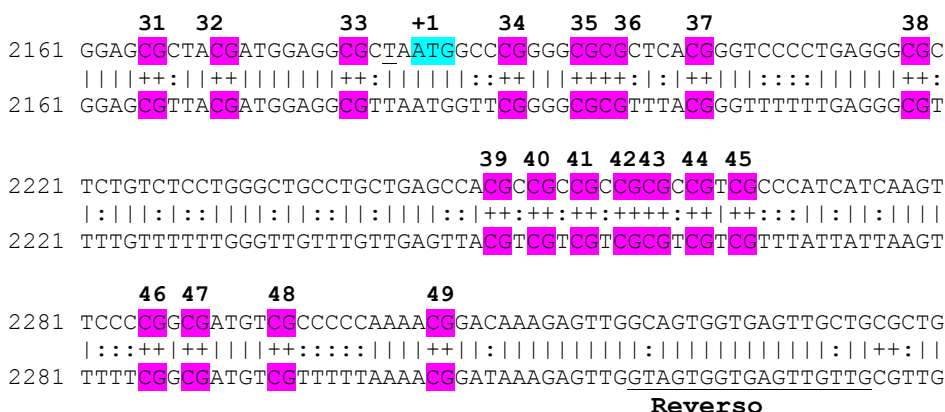


FIGURA 17 - ILHA DE CpG 2 DO GENE *MMP2* AMPLIFICADA POR PCR. Sequência de DNA obtida com auxílio do programa *Methprimer*. A linha superior representa o DNA alvo sem tratamento, e na linha inferior após o tratamento com bissulfito de sódio. Os iniciadores estão mostrados na sequência. Os CG estão marcados em rosa na sequência e o ATG inicial em azul. O +1 (em relação ao início do sítio de transcrição – TSS) está sublinhado na sequência.

Fonte: Adaptado de *Methprimer*.

Para avaliar a presença de sítios de ligação de fatores de transcrição na região promotora do gene *MMP2*, a região de DNA contendo os 4306 pares de bases (pb) englobando a região 5' UTR, foi avaliada utilizando o *software* livre *TF search* (Genomatix) (Anexo).

4.2.4 Clonagem da ilha de CpG do gene *MMP2* de diferentes linhagens tumorais de mama

Para a clonagem foram utilizados os DNAs das linhagens após o tratamento com bissulfito (item 4.2.2). A ilha de CpG do gene *MMP2* de todas as linhagens foi amplificada e os produtos foram purificados a partir da eletroforese em gel de agarose 1% utilizando o protocolo *Quick Gel Extration Kit Protocols* (Qiagen). Os produtos purificados foram em seguida clonados no vetor *pGEMT®easy* (Promega), e eletroporados em estirpe de *Escherichia coli* DH10B. Os clones recombinantes foram selecionados por α -complementação e submetidos à reação de PCR da colônia para a confirmação da presença do inserto. Pelo menos oito clones positivos na PCR de colônia foram submetidos à extração de DNA plasmidial utilizando o *kit QiaPrep* (Qiagen). Em torno de 300 a 500 ng de cada preparação foram sequenciados utilizando-se *kit Big Dye terminator* e o sequenciador *XL Genetic Analyzer* (Applied Biosystems).

4.3 AVALIAÇÃO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO DO GENE *MMP2* EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA

As linhagens tumorais foram cultivadas e o RNA total foi isolado de um número aproximado de $2 - 4 \times 10^6$ células utilizando *TRIzol Reagent* (Life Technologies, USA). Seguindo as especificações do fabricante foi realizada a síntese do cDNA utilizando aproximadamente 1000 ng de RNA total, 200 U da enzima de transcriptase reversa (*Superscript II*, Gibco BRL), 25 μ moles do iniciador OligodT, tampão 1X, 25 U de inibidor de RNase (Promega) e 200 μ M de dNTPs em uma reação com volume final de 20 μ L. Primeiro o RNA molde foi incubado com o Oligo dT a 65°C por 5 minutos e em seguida foi feita síntese a 42°C por 60 minutos, seguido de 72°C por 15 minutos. Para a síntese de cDNA da linhagem MCF7 quando esta foi submetida a diferentes tratamentos (item 4.4) foi utilizado a enzima *Sensiscript* (Qiagen), utilizando aproximadamente 500 ng de RNA total, utilizando 1 μ M de Oligo dT (Promega), 1X de solução tampão, 10 U de inibidor de RNase (Promega) e 0,5 mM de dNTPs em um sistema de 20 μ L. A síntese foi realizada a 37°C por 60 minutos. O gene de expressão constitutiva *GAPDH* foi utilizado como normalizador endógeno. Os iniciadores específicos e as condições de amplificação para o gene estão descritos na Tabela 1 (anexo).

Para a reação de RT-PCR foi utilizado 1 μ L de cDNA, tampão 1X, 1,5 mM $MgCl_2$, 200 μ M dNTPs, 1U *Taq* Platinum (Invitrogen) e 8 μ moles de iniciadores específicos em um volume final de 20 μ L. Os iniciadores específicos e as condições de amplificação para o gene *MMP2* estão descritos na Tabela 1 (anexo).

Os produtos das reações de RT-PCR, foram visualizados por eletroforeses em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo 0,2 μ g/ml (Sambrook & Russel, 2001).

4.4 TRATAMENTOS NO CULTIVO DA LINHAGEM MCF7

A linhagem MCF7 foi submetida ao tratamento com 5-aza-2'-deoxicitidina (Decitabina® - nome comercial) (5-Aza), Tricostatin A (TSA), fibronectina descritos a seguir. Todos os ensaios foram feitos em triplicatas.

4.4.1. Tratamento com 5-aza-2'-deoxicitidina (5-Aza) e Tricostatin A (TSA)

Para cada ensaio foi utilizado em torno de 5×10^5 de células. O ensaio foi feito simultaneamente em 4 cultivos separados, controle sem tratamento, 5-Aza, TSA, TSA e 5-Aza. Todos os cultivos tiveram o meio trocado diariamente bem como do reagente por 96 h (4 dias). O tratamento com 5-Aza foi feito com $1 \mu\text{M}$ do reagente (Pryzbylowski *et al.*, 2007) adicionados diariamente à cultura. O tratamento com TSA foi feito incubando as células por 80 h seguido da adição de TSA $40 \mu\text{M}$ por 16 horas. No tratamento com 5-Aza e TSA, primeiro foi realizado o tratamento com 5-Aza por 80 h seguido do tratamento com 5-Aza e TSA $40 \mu\text{M}$ nas últimas 16h. Após o período total deste ensaio, o DNA e RNA foram extraídos simultaneamente utilizando o *AllPrep Kit* (Qiagen).

4.4.2 Cultivo com Fibronectina

Para este tratamento, aproximadamente 1×10^6 células foram cultivadas. Após o cultivo as células foram lavadas duas vezes com PBS 1x, retiradas da garrafa utilizando tripsina por 4 minutos, centrifugadas e lavadas três vezes com meio RPMI sem soro fetal bovino (SFB). Após as lavagens as células foram ressuspensas em meio RPMI sem SFB e contadas. Cerca de 3×10^5 de células foram adicionadas a 3 poços de 35 mm^2 que haviam sido previamente tratados com $15 \mu\text{g/mL}$ de fibronectina (Sigma) (Das *et al.*, 2008). Como controle, as células foram cultivadas do mesmo modo, sem a presença da fibronectina. As placas foram incubadas por três e cinco horas em estufa 37°C , com atmosfera de 5% de CO_2 . Após estes períodos, o DNA e RNA foram extraídos simultaneamente utilizando o kit *AllPrep* (Qiagen).

4.5 ENSAIOS DO POTENCIAL MIGRATÓRIO E INVASIVO DA MCF7

Os ensaios de migração e de invasão foram realizados no Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o câncer, no Hospital Sírio Libanês – SP e contou com o auxílio do pesquisador Erico T. Costa. Inicialmente, a linhagem MCF7 foi submetida ao tratamento com fibronectina (item 4.4.2).

4.5.1 Ensaio de Migração haptotática

Placas de 24 poços de *transwell* (Costar®) contendo membranas com poros de 8 μm foram utilizadas para este ensaio. Dezesesseis horas antes do início do ensaio, as câmaras inferiores das placas de *transwell* foram incubadas com uma solução de 20 $\mu\text{g/mL}$ de colágeno tipo I (BD Biosciences) em PBS (300 μL /poço). Decorrido este período, os poços foram lavados (2x com PBS 1x) e os *transwells* mantidos em meio RPMI sem SFB a 4°C até o início do ensaio. No dia do ensaio, após o período de 5h de tratamento com fibronectina, as células foram soltas da placa com tripsina e uma suspensão 4×10^4 de células em 100 μL de RPMI (sem SFB) foi colocada na câmara superior do poço de transmigração. Na câmara inferior, junto ao colágeno previamente adicionado, foram acrescidos 600 μL de RPMI completo e a placa foi incubada em estufa de CO₂ 5%, 37°C por aproximadamente 14h. A técnica foi realizada em duplicatas e em dois dias diferentes, tanto para o controle quanto para o tratamento.

4.5.2 Ensaio de Invasão quimiotática em *transwell*

Duas horas antes do início do ensaio, nas câmaras superiores de poços de *transwell* (Costar®) (com membranas com poros de 8 μm) foram adicionados 100 μL de uma matriz de colágeno tipo I a 1,5 mg/mL (BD Biosciences) em RPMI sem SFB e incubadas a 37°C por 30 minutos para solidificação do colágeno. Acima da membrana porosa formou-se uma camada semi-sólida de colágeno de 1 mm de espessura. A matriz de colágeno foi previamente preparada usando tampão de reconstituição 10 x (0,05 M de NaOH, 2,2% de NaHCO₃, 200 mM HEPES). Após o período das 5h de cultivo com a fibronectina, as células foram soltas da placa com tripsina, e uma suspensão de 2×10^4 de células em 100 μL de RPMI (sem SFB) foi colocado sobre a matriz de colágeno, na câmara superior do poço de transmigração. Na câmara inferior foram adicionados 600 μL de RPMI + 10% SFB (fator quimiotático) e a placa foi incubada em estufa de CO₂ 5%, 37°C por 48h e 72h. A técnica foi realizada em duplicatas em dois dias diferentes tanto para o controle quanto para o tratamento

4.5.2.1 Revelação por DAPI e Cristal Violeta

Após os tempos de incubação dos ensaios de migração e invasão, as células foram coradas por dois métodos. Para o ensaio de migração, os *transwells* foram transferidos para poços da placa contendo PBS 1x e secos por dentro. Já para o

ensaio de invasão, a cobertura de colágeno foi descartada e os filtros secos internamente com a haste flexível para a retirada das células que não migraram.

Para visualização e quantificação das células migratórias ou invasivas nos ensaios em poços de *transwell* foi utilizado o corante fluorescente de DNA, DAPI (4',6-diamino-2-fenil indol). Para tal, decorrido o tempo de migração (14h) ou de invasão (42 h ou 72h), os poços de *transwell* foram lavados com PBS 1x e as células fixadas com formaldeído 1 % por 10 minutos em TA. Em seguida, foram lavados por cinco vezes com PBS 1x e a câmara superior de cada poço foi limpa e seca com o auxílio de uma haste flexível com algodão. Os núcleos das células migratórias e invasivas, localizadas na porção inferior da membrana porosa foram corados com 30 µL de DAPI (1:1000) por 5 minutos e lavados 3x em PBS 1x. O número de células migratórias ou invasivas, localizadas na porção inferior das membranas porosas, foi avaliado em microscópio de fluorescência usando filtros específicos para o fluoróforo DAPI (UV 330-338). Os números de núcleos corados com o DAPI foram contados em 20 campos ópticos independentes em cada condição experimental.

Para a coloração com cristal violeta, os filtros foram incubados em uma solução de cristal violeta 0,1% (p/v) com metanol 20%, colocados na placa de 24 poços e incubados por 10 min, TA. Em seguida, os filtros foram lavados em água corrente para retirar o excesso de corante e adicionado 300 µL de uma solução de SDS 2% e incubados 5 min em TA para solubilização do corante. Com o auxílio de uma micropipeta, 150 µL do volume foi coletado e transferido em triplicada de 50 µL, para uma placa de 96 poços e levados a um leitor óptico em comprimento de onda de 595 nm para medição da absorbância. Os valores obtidos foram normalizados e submetidos ao ensaio estatístico de teste *t* no *software* Prisma v. 5. Valores de $p < 0.05$ foram considerados significativos.

4.5.3 Ensaio de Invasão tridimensional em matrizes de colágeno

Em poços de placas de 48 poços foram adicionados 200 µL de agarose *low melting* 1% em RPMI puro/poço até a solidificação à temperatura ambiente. No dia do ensaio, após o período de 5h de tratamento com fibronectina, as células foram soltas da placa com tripsina e uma suspensão de 4×10^4 células MCF7/poço em 500 µL de meio completo foram plaqueadas sobre esta camada não aderente de agarose e mantidas em estufa nas condições padrão de cultura por 3-5 dias. A cada dia as placas

foram gentilmente agitadas, em movimentos circulares por 30 segundos. Após este período, por agregação espontânea, são formados os esferóides tumorais multicelulares (ou MTS, *multicellular tumor spheroids*) facilmente manipulados, coletados e transferidos com micropipeta estéril para serem utilizados nos ensaios de invasão tridimensional (Ravanti *et al.*, 1999). A capacidade invasiva das células MCF7 foi analisada em matrizes 3D de colágeno tipo I (1,5 mg/mL) (BD Biosciences). Os MTSs foram transferidos para novos poços de placas de 48 poços, contendo uma camada inferior não aderente de 200 µL de agarose *low melting* 1%, previamente solidificada, sob uma camada de 400 µL de solução 1,5 mg/mL de colágeno tipo-I na presença ou ausência de fibronectina (FN a 20 µg/mL) ainda líquidas (à 4°C). Estes MTSs foram submersos nas camadas 3D de colágeno ou colágeno+FN e incubados na estufa 37°C por 1h para gelificação. Após a gelificação foi adicionado 500 µL de meio completo sobre o conjunto. Após sete dias da submersão, o processo de invasão nas camadas 3D de colágeno foi observado e acompanhado sob microscópio invertido. Como controle positivo de invasão foram utilizados MTS constituídos por células da linhagem invasiva MDA-MB-435 e submetidos às mesmas condições experimentais.

4.6 IMUNOPRECIPITAÇÃO DE CROMATINA DA LINHAGEM MCF7 - ChIP

Esta técnica foi utilizada com a linhagem MCF7 cultivada na presença ou ausência de fibronectina (15 µg/mL). Em uma placa de 60 mm de diâmetro, foram adicionadas aproximadamente 6×10^6 células e incubadas por 5 horas. Após este período, o meio das células foi aspirado e adicionado 10 mL de PBS 1x estéril com formaldeído 1%. Após a incubação da placa por 10 min a 37°C foi adicionado 400 µL de glicina 2,5 M (concentração final de 0,1 M) e incubado por 5 min em temperatura ambiente. Em seguida, as células foram lavadas 3 x com 9 mL de PBS 1x gelado. As etapas seguintes foram realizadas utilizando o protocolo do kit *EpiTect® ChIP One Day* (Qiagen) seguindo as recomendações do fabricante. Aproximadamente 2,5 mL de tampão de raspagem (PBS 1x contendo coquetel de inibidor de protease 1x) foram adicionados à placa e as células foram raspadas da superfície plástica com o auxílio de uma haste de borracha. O volume de células foi transferido para um tubo de 2 mL e centrifugado 800 x g, 4°C por 10 min. O sobrenadante foi descartado e adicionado

400 µL de tampão de lise contendo inibidor de protease nas células precipitadas. O volume de células foi submetido à lise por sonicação no aparelho Covaris® com 13 ciclos de 60 seg (sob as condições *Duty* – 5%, *Intensity* – 2, *Cycles/Burst* – 200) e centrifugados a 14000 xg por 10 min a 4°C. Em seguida, as amostras foram submetidas ao clareamento que consiste da incubação com *beads* de proteína A. O sobrenadante foi dividido em quatro alíquotas e imunoprecipitadas com anticorpos anti-histonas (H3K27me3, H3K4me3, H3K9me3 e o controle H3) (Qiagen) a uma concentração de 2 µg/mL cada, por aproximadamente 16 h em homogeneizador rotatório a 4°C. Em seguida, os fragmentos ligados aos anticorpos foram tratados com *beads* de proteína A e lavados com sucessivos tampões. O DNA foi isolado, transferido para a coluna de separação e em seguida eluído, conforme especificações do fabricante. As amostras foram quantificadas no equipamento *Nanodrop 2000*.

4.7 QUANTIFICAÇÃO POR qPCR DAS AMOSTRAS TRATADAS

4.7.1 Quantificação dos transcritos após extração de RNA

O produto de amplificação do gene *MMP2* na linhagem MCF7 tratada com diferentes reagentes foi submetido à técnica de qPCR. Os genes normalizadores *GAPDH*, *HPRT* e *HMBS* foram utilizados neste ensaio, junto ao gene alvo *MMP2* (Tabela 1 - anexos). Para este ensaio foi realizado a curva de eficiência de cada par de iniciador e o fator diluente das amostras. A linhagem PMC42 que expressa o gene *MMP2* foi utilizada como padrão. O controle negativo consistiu da adição de todos os produtos necessários para a síntese do cDNA, exceto a enzima transcriptase reversa. Para o protocolo de PCR em tempo real foram utilizados o *SYBR®Green 1x* (Applied Biosystems), os iniciadores em concentrações testes de 400 nM, 600 nM e 900 nM; e o cDNA alvo em diluições testes de 1:1, 1:10, 1:100, 1:1000 e 1:10000 em sistemas de 10 µL no equipamento *StepOne Plus* (Applied Biosystems). Verificada a eficiência, as concentrações definidas para o ensaio foram de 600 nM para os todos os iniciadores e 1 µL de volume de amostra. Para o cálculo, o valor de Ct obtido da amplificação do transcrito de *MMP2* sob os tratamentos ao qual a MCF7 foi submetida, foi descontado da média dos valores de Ct dos normalizadores e aplicados na fórmula de $\log_2^{2^{-\Delta\Delta CT}}$ (Livak & Schmittgen, 2001). Os valores de Ct obtidos foram avaliados pelo teste estatístico ANOVA e considerados significativos se $p < 0,05$.

4.7.2 Quantificação por qPCR após a imunoprecipitação de cromatina

Para o ensaio de ChIP, os controles endógenos testados foram os genes *MYOD1* (controle positivo para H3K27me3), *GAPDH* (controle positivo para H3K27me3 e H3K4me3) e *SAT2* (controle positivo para H3K9me3) em concentrações dos iniciadores de 400 nM de acordo com o protocolo do kit *EpiTect® ChIP One Day* (Qiagen). O gene *GAPDH* foi escolhido como normalizador neste ensaio. Em sistemas de 10 µL, 25 ng de DNA imunoprecipitado foi utilizado contendo 6 µL de *SYBR®Green* 1x (Applied Biosystems) e 600 nM dos iniciadores nomeados de B1 e B2 (Chernov *et al.*, 2009) (Tabela 1 – anexo) e 400 nM do *GAPDH* conforme especificações do fabricante (Qiagen). Para os cálculos, os valores foram normalizados pela razão entre os valores de Ct do gene alvo em relação ao Ct do gene controle. Os valores de Ct obtidos foram avaliados pelo teste estatístico ANOVA e considerados significativos se $p < 0,05$.

4.8 ANÁLISE DA ATIVIDADE DE METALOPROTEASE DE MMP-2

A atividade de metaloprotease da MMP-2 foi avaliada utilizando a técnica de zimografia (Kleiner & Stetler-Stevenson, 1994). Esta técnica consiste de um SDS-PAGE impregnado com um substrato que será degradado pela proteína que se quer analisar. O substrato utilizado para avaliar a atividade da enzima MMP-2 foi a gelatina (Leber & Balkwill, 1997). Na zimografia foram testados os sobrenadantes das culturas das linhagens MCF7 controle sem tratamento, PMC42 (controle positivo) e dos cultivos de células tratadas com 5-Aza, TSA, 5-Aza+TSA e fibronectina 5h.

No último dia de cada tratamento respectivamente, um mililitro de sobrenadante foi coletado, transferido para um tubo tipo eppendorf e centrifugado a 8000 x g por 10 minutos. Ao sobrenadante foi adicionado 30 µL da resina *Sepharose-Agarose* (Sigma), pré-lavada com TBST 1x gelado, e deixado sob rotação por 2 h a 4°C. Em seguida, o tubo tipo eppendorf foi centrifugado por 10000 x g por 10 minutos e o precipitado foi lavado três vezes com tampão TBST 1x gelado. O *pellet* foi ressuspensionado em tampão de amostra (0,075 g Tris, 0,2 g SDS em 10 mL de água destilada, pH 6,8), misturado a um tampão de eletroforese contendo fenol *blue* sem agentes redutores (Laemmli, 1970) e aplicado em SDS-PAGE 8% co-polimerizado

com gelatina 0,1% pré-aquecida a 60°C. Após a eletroforese em tampão adequado (Tris 25 mM, 250 mM de Glicina e SDS 0,1%), o gel foi lavado duas vezes em Triton-X 2,5% pré-aquecido a 37°C por 30 minutos cada para a retirada total do SDS. Em seguida o gel foi acondicionado em tampão de incubação (CaCl₂ 5 mM e ZnSO₄ 1 µM) a 37°C por aproximadamente 48 h. A atividade de protease foi visualizada através de bandas descoloridas no gel, após a coloração e descoloração simultânea com *coomassie blue* conforme o protocolo (Leber & Balkwill, 1997).

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO GENE *MMP2* EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA

A expressão do gene *MMP2* foi avaliada em diferentes linhagens tumorais de mama através da técnica de RT-PCR. A eficiência de síntese de cDNA foi avaliada pela expressão do gene constitutivo *GAPDH* e todas as amostras apresentaram o fragmento de 296 pb (Figura 18).

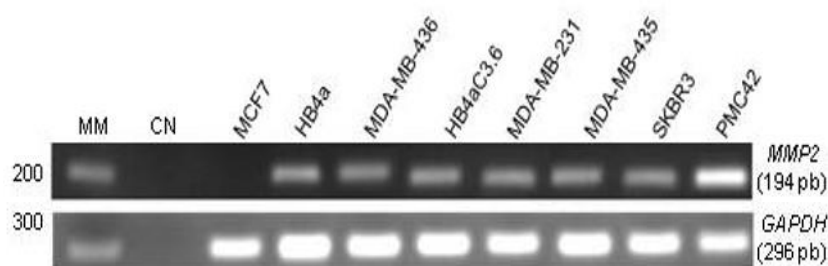


FIGURA 18 - RT-PCR DOS GENES *MMP2* E *GAPDH* EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA. O marcador de massa molecular (MM) corresponde ao 100 bp. À esquerda da figura encontra-se o fragmento do marcador correspondente à altura do fragmento alvo desejado. CN corresponde ao controle negativo da reação, sem a adição cDNA na reação de PCR. As linhagens utilizadas para a análise de expressão dos genes de interesse estão representadas acima da figura. Para o gene *MMP2* o tamanho do fragmento esperado é de 194 pb, e para o gene *GAPDH* o fragmento esperado é de 296 pb (conforme tamanhos descritos à direita da figura).

Os resultados de RT-PCR mostraram que todas as linhagens testadas expressam o gene *MMP2*, exceto a linhagem MCF7.

5.2 PERFIL DE METILAÇÃO DA ILHA DE CpG 2 DO GENE *MMP2* EM LINHAGENS TUMORAIS DE MAMA

Para avaliar o perfil de metilação da ilha de CpG 2 do gene *MMP2*, a região de interesse foi amplificada, clonada e sequenciada nas linhagens normais e tumorais de mama. Os resultados obtidos foram posteriormente avaliados em conjunto com os dados de expressão gênica.

5.2.1 Perfil de Metilação da Ilha de CpG 2 do gene *MMP2*

Os resultados de sequenciamento (Figura 19) obtidos da ilha de CpG 2 do gene *MMP2* mostraram que as linhagens de mama normais HB4a (A) e HB4aC3.6 (B), que

expressam o gene *MMP2*, apresentaram perfil de metilação global de 18% e de 44%, respectivamente. Já as linhagens tumorais PMC42 (C) e SKBR3 (D), que também expressam *MMP2*, apresentaram perfil de metilação de 25% e 30%, respectivamente. As linhagens tumorais que expressam baixos níveis de *MMP2*, MDA-MB-435 (E) mostrou uma taxa de 94% enquanto a linhagem MDA-MB-231 (F) obteve 86% de metilação global. As linhagens que não expressam *MMP2*, MCF7 (H) e MDA-MB-436 (G) apresentaram 90% e 58% de metilação global, respectivamente.

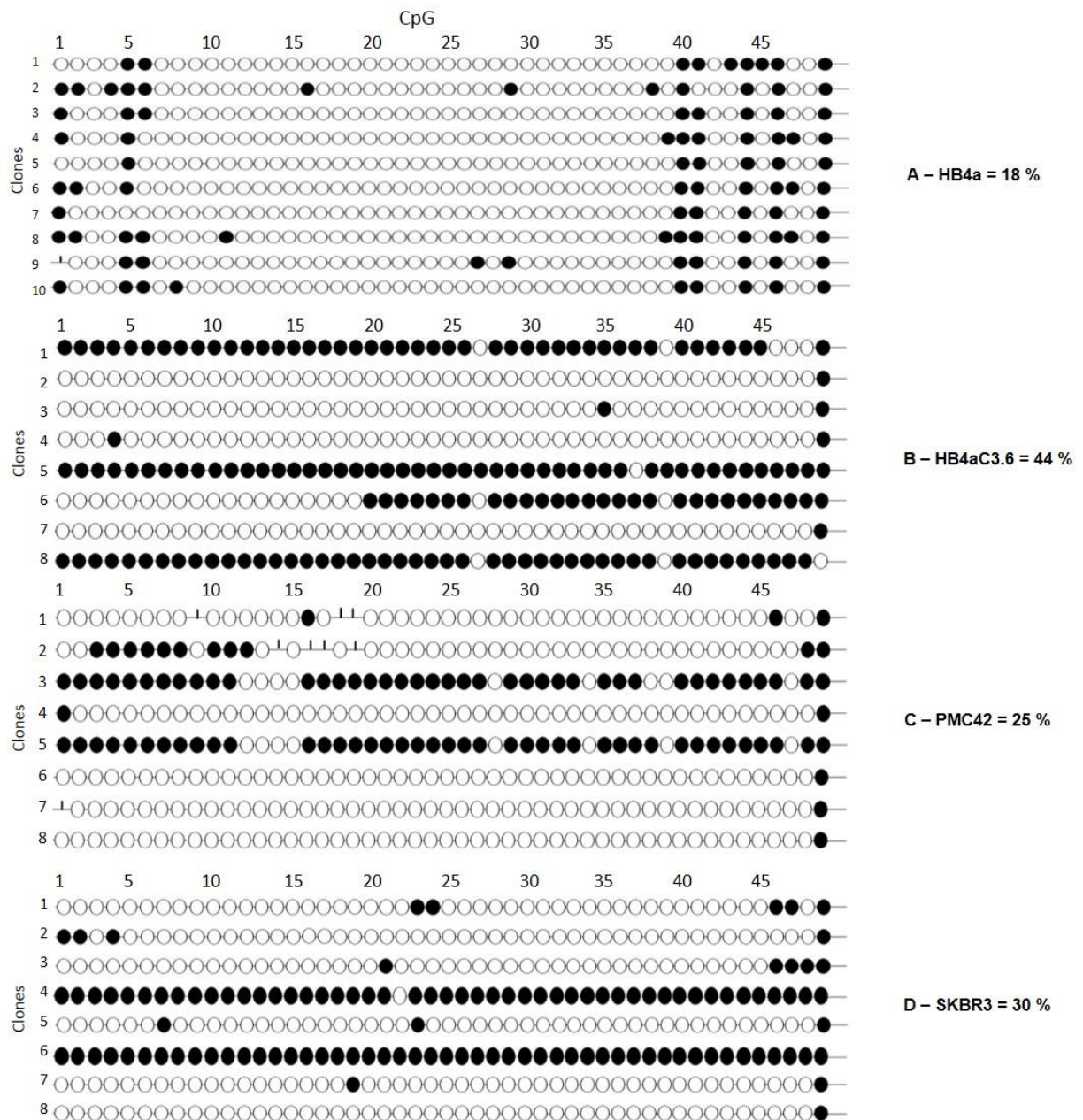




FIGURA 19 - PERFIL DE METILAÇÃO DA ILHA DE CpG 2 DA REGIÃO PROMOTORA DO GENE *MMP2* EM LINHAGENS DE MAMA. A) HB4a, B) HB4aC3.6, C) PMC-42, D) SKBR-3, E) MDA-MB-435, F) MDA-MB-231, G) MDA-MB-436, H) MCF7. Os clones estão alinhados paralelamente nas figuras, representado por cada linha contendo os círculos brancos e pretos. Cada dinucleotídeo (49) está representado por um círculo, sendo que os círculos fechados representam as citosinas metiladas, e os círculos brancos, ou abertos, as citosinas não metiladas. Os traços correspondem às CGs indeterminados quanto ao seu perfil de metilação. A numeração acima dos círculos corresponde à numeração dos CGs na ilha de CpG 2 sequenciada.

Os resultados mostram que os dados de expressão gênica obtidos no ensaio de RT-PCR (Figura 18) estão de acordo com o perfil de metilação global (Figura 19). As linhagens que expressam o gene apresentam metilação próximo a 50%, compatível com a expressão observada. Por outro lado, a linhagem que não expressa o gene apresentou valor superior de 60% de metilação global, condizente com a falta de expressão de *MMP2*.

5.2.2 Efeito da inibição da metilação do DNA e da desacetilação de histonas na expressão do gene *MMP2*

Para confirmar a participação de mecanismos epigenéticos na regulação da expressão do gene *MMP2*, a linhagem MCF7 foi tratada em cultura com o reagente análogo da citosina 5-aza-2'-deoxicitidina (5-Aza) e com o reagente inibidor de HDACs tricostatin A (TSA). O 5-Aza possui ação inibidora sobre a função da DNMT1 confere uma desmetilação progressiva quando colocado em cultura (Momparker *et al.*, 1984) enquanto o TSA inibe a desacetilação pelas enzimas responsáveis. O resultado destes tratamentos sobre a expressão de *MMP2* podem ser visualizados na Figura 20.

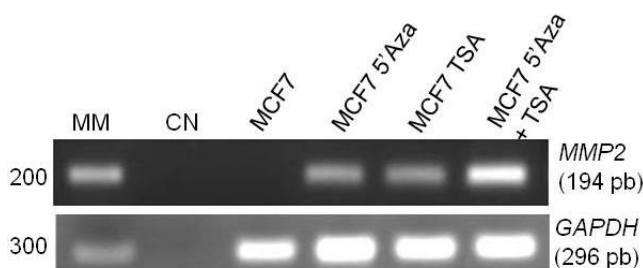


FIGURA 20 - RT-PCR DA LINHAGEM MCF7 CULTIVADA COM 5-AZA, TSA E 5-AZA+TSA. MM é o marcador molecular 100 bp e CN o controle negativo da reação. Na sequência estão mostrados os resultados de expressão da linhagem MCF7 sem tratamento e quando submetida aos tratamentos com 5-Aza, TSA, 5 Aza e TSA. Abaixo está mostrado a expressão do gene *GAPDH* em cada condição.

O experimento de RT-PCR (Figura 20) mostrou que a linhagem MCF7 submetida ao tratamento com 5-Aza é capaz de expressar *MMP2*, como já descrito na literatura (Chernov *et al.*, 2009). Quando a linhagem foi submetida ao tratamento com TSA também foi observado a expressão do gene. Quando os dois reagentes, 5-Aza e TSA foram utilizados em conjunto na cultura, a linhagem apresentou maior intensidade no fragmento observado quando comparado somente com os tratamentos isolados.

5.2.3 Efeito da inibição da metilação do DNA e da desacetilação de histonas na sequência da ilha de CpG 2 do gene *MMP2*

Para avaliar como a metilação ou as modificações nas histonas interferem na metilação da ilha de CpG 2 do gene *MMP2*, as amostras da linhagem MCF7 cultivada com 5-Aza, TSA e 5-Aza + TSA, tiveram o DNA extraído e tratado com bissulfito de sódio. Após o tratamento, a ilha de CpG de *MMP2* foi amplificada, purificada, clonada

e sequenciada (Figura 21) (os resultados da linhagem MCF7 está sendo novamente mostrada para a comparação dos tratamentos).

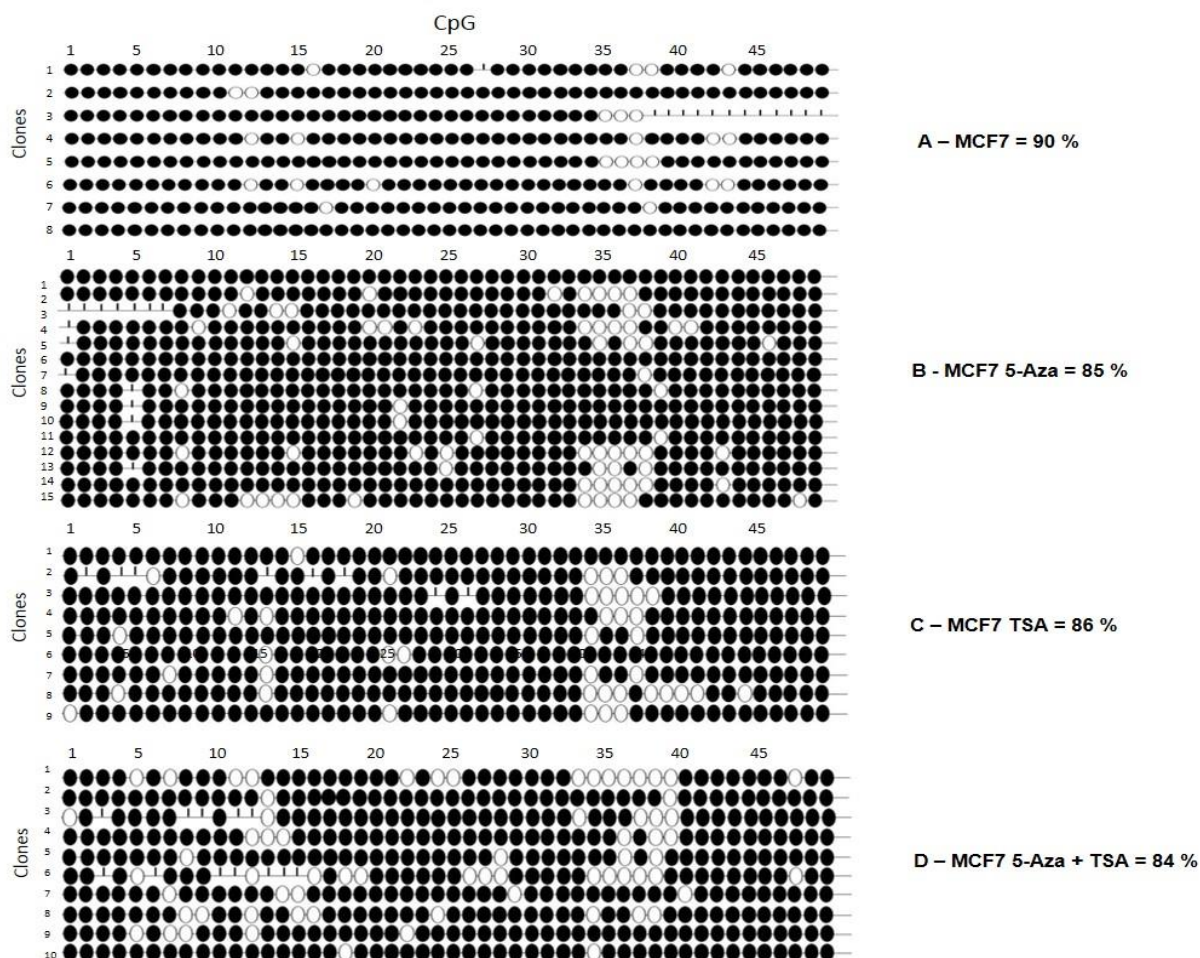


FIGURA 21 - SEQUENCIAMENTO DA ILHA 2 DO GENE MMP2 DA LINHAGEM MCF7 TRATADA COM 5-AZA, TSA E AMBOS. A) MCF7 controle (sem tratamento), B) MCF7 cultivada com 5-Aza, C) MCF7 cultivada com TSA, e D) MCF7 cultivada com TSA+5-Aza. Os clones estão alinhados paralelamente nas figuras, representado por cada linha contendo os círculos brancos e pretos. Cada dinucleotídeo (49) está representado por um círculo, sendo que os círculos fechados representam as citosinas metiladas, e os círculos brancos, ou abertos, as citosinas não metiladas. Os traços correspondem à CGs indeterminados quanto ao seu perfil de metilação. A numeração acima dos círculos corresponde à numeração dos CGs na ilha de CpG 2 sequenciada.

O sequenciamento da linhagem MCF7 cultivada com 5-Aza mostrou que, embora tenha sido observada a expressão de *MMP2*, a taxa de metilação global da região analisada diminuiu em 5% (de 90% para 85%). Com intuito de confirmar o resultado obtido nesta condição, mais clones (15) em dois tratamentos distintos com 5-Aza foram avaliados e este resultado permaneceu inalterado. A desmetilação dos dinucleotídeos 34 ao 38 mostrou-se frequente nas amostras tratadas com 5-Aza.

Para o cultivo somente com TSA, os resultados obtidos são praticamente os mesmos daqueles obtidos com 5-Aza, apresentando o valor de 86% de metilação global, diminuindo portanto, em 4%.

Por outro lado, o tratamento da MCF7 com 5-Aza e TSA concomitantemente que parece ter mais influência na expressão de *MMP2* conforme os resultados obtidos no RT-PCR (Figura 20). Contudo, a metilação global diminuiu somente em torno de 6% em relação à linhagem controle. O processo de desmetilação observado nesses tratamentos, apesar de pouco proeminente, foi suficiente para promover a expressão do gene *MMP2*.

5.3 ATUAÇÃO DA FIBRONECTINA NA EXPRESSÃO DO GENE *MMP2* NA LINHAGEM MCF7

Diversos autores vêm mostrando que as células tumorais que não expressam ou que possuem baixos níveis de expressão de MMP-2, quando são cultivadas em meio contendo fibronectina passam a expressar a enzima (Esparza *et al.*, 1999; Das *et al.*, 2008; Kenny *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2009; Jiao *et al.*, 2012; Moroz *et al.*, 2013; Park & Schwarzbauer, 2013).

Com intuito de confirmar o processo de expressão do gene tal como já descrito na literatura, a linhagem MCF7 foi cultivada em meio sem a presença de soro fetal bovino com fibronectina adsorvida à garrafa por períodos de 3 e de 5 h e a expressão de *MMP2* foi avaliada por RT-PCR (Figura 22).

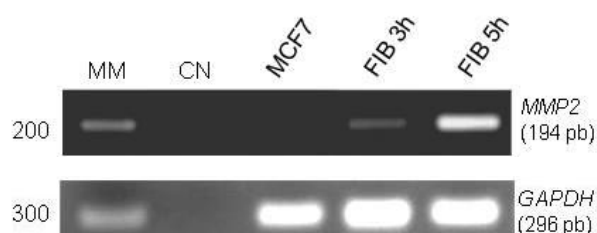


FIGURA 22 - RT-PCR MCF7 CULTIVADA COM FIBRONECTINA. MM - marcador molecular, MCF7 - cultura sem tratamento, Fib 3h - cultivo com fibronectina por 3 h, Fib 5h - cultivo com fibronectina por 5 h. Abaixo da figura encontra-se o gene constitutivo *GAPDH* expresso em todas as condições.

A linhagem MCF7 após cultivo com a fibronectina foi capaz expressar o gene *MMP2* tal como observado no ensaio com 5-Aza e TSA (Figura 20). Este resultado

indica que a interação entre as células e a fibronectina foi suficiente para ativar a expressão do gene *MMP2* nas condições testadas.

5.3.1 PCR em Tempo Real

Após a linhagem MCF7 ser submetida aos diferentes tratamentos, foi realizada a quantificação do transcrito de *MMP2* por qPCR. As concentrações de iniciadores foram testadas juntamente com as diluições do molde. O resultado da eficiência dos iniciadores endógenos foi de 77% para o gene *GAPDH*, de 98% para o gene *HMBS*, e de 94% para o gene *HPRT*. Todos os endógenos foram utilizados durante a reação de qPCR, juntamente com o gene alvo *MMP2*, com sua eficiência de 100%. A partir das eficiências determinadas, o gene *HMBS* foi utilizado no cálculo da expressão relativa de *MMP2* sob as diferentes condições testadas e que pode ser visualizado na Figura 23.

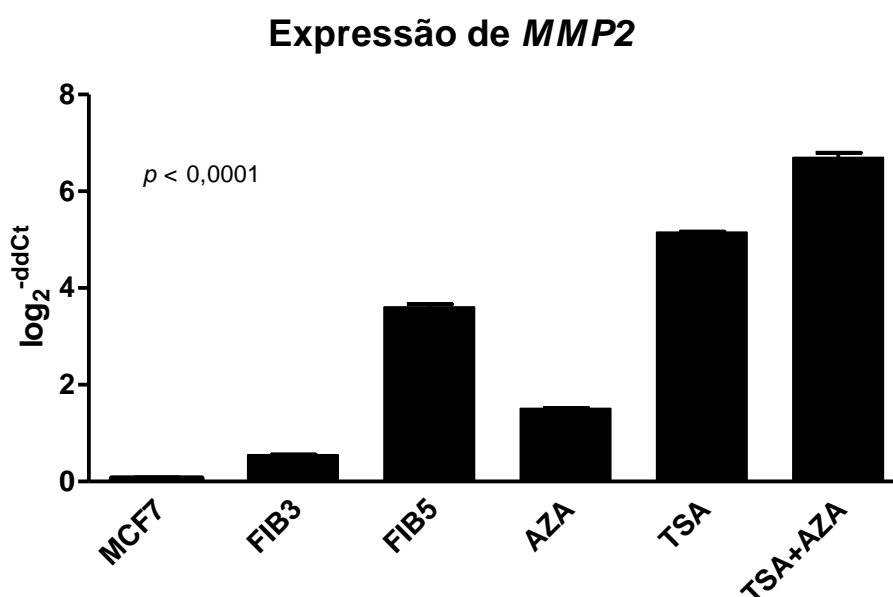


FIGURA 23 - qPCR DE *MMP2* NA LINHAGEM MCF7 SOB DIFERENTES CONDIÇÕES DE CULTIVO. MCF7 - controle, FIB3 - MCF7 cultivada com fibronectina por 3h, FIB5 - MCF7 cultivada com fibronectina por 5h, AZA - MCF7 tratada com 5-Aza, TSA - MCF7 tratada com TSA, TSA+AZA - MCF7 tratada com 5-Aza + TSA. Os valores do gráficos estão expressos em \log_2 da variação da expressão entre as condições avaliadas.

Os resultados obtidos da expressão relativa da linhagem MCF7 quando tratada com 5-Aza, TSA, 5-Aza e TSA e cultivada com fibronectina por 3 ou 5 h mostraram que a linhagem foi capaz de expressar *MMP2* com valores relativos superiores e significativos estatisticamente quando comparados com o controle sem tratamento

($p < 0,0001$). Este resultado, portanto, confirma e quantifica a visualização do resultado por RT-PCR visto anteriormente.

5.3.2 Ensaio de atividade da MMP-2 por Zimografia

O ensaio de zimograma foi realizado em paralelo à análise da expressão de *MMP2*, uma vez que seu potencial de ativação enzimática também deve ser avaliado simultaneamente (Leber & Balkwill, 1997; La Rocca *et al.*, 2004; Mitra *et al.*, 2006; Das *et al.*, 2008; Figueira *et al.*, 2009). Esta técnica possibilita avaliar a existência da proteína e também de sua atividade como gelatinase nas amostras de interesse (Stetler-Stevenson, 1990). Após os tratamentos, os sobrenadantes das culturas foram avaliados por zimografia e as formas pró e ativas de MMP-2 estão mostrados na Figura 24.

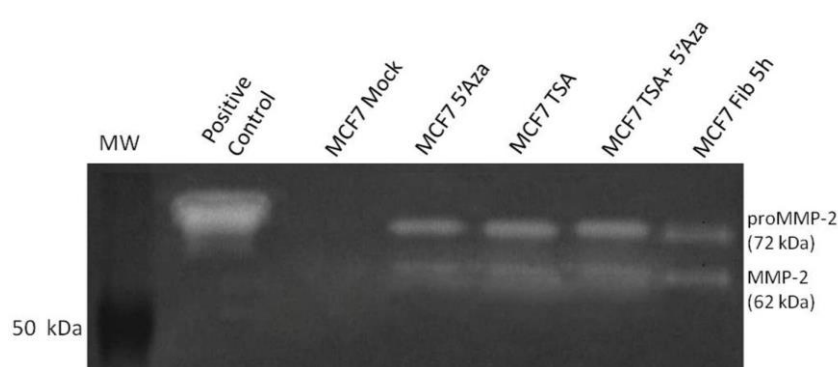


FIGURA 24 - ZIMOGRAMA DA LINHAGEM MCF7 E SEUS TRATAMENTOS. MW - marcador de massa molecular. Controle positivo - PMC42 (expressa *MMP2*), MCF7 *mock* - linhagem controle (sem tratamento), 5-Aza - MCF7 tratada com 5-Aza, TSA - MCF7 tratada com TSA, 5-Aza + TSA - MCF7 tratada com 5-Aza+TSA, MCF7 Fib 5h - cultivo com fibronectina por 5 horas. As bandas correspondem às formas pró-MMP-2 (72 kDa) e ativas (62 kDa) de MMP-2.

A linhagem MCF7 submetida aos tratamentos com 5-Aza, TSA, 5-Aza+TSA e fibronectina 5h foi capaz de produzir a proteína MMP-2 ativa. Suas formas, de 72 e 62 kDa, provavelmente, refletem as formas pró-MMP-2 e MMP-2 ativa, respectivamente, e foram observadas neste ensaio corroborando àqueles obtidos na expressão gênica.

5.3.3 Metilação Global da ilha de CpG 2 do gene *MMP2* após cultivo com fibronectina

Para avaliar se a fibronectina tem o potencial de atuar no processo de metilação na região promotora do gene *MMP2*, a linhagem MCF7 foi cultivada com fibronectina durante 3 e 5 horas. Em seguida, o DNA total foi extraído e tratado com bissulfito de

sódio. A região promotora de *MMP2* foi amplificada, purificada, clonada e sequenciada (Figura 25).

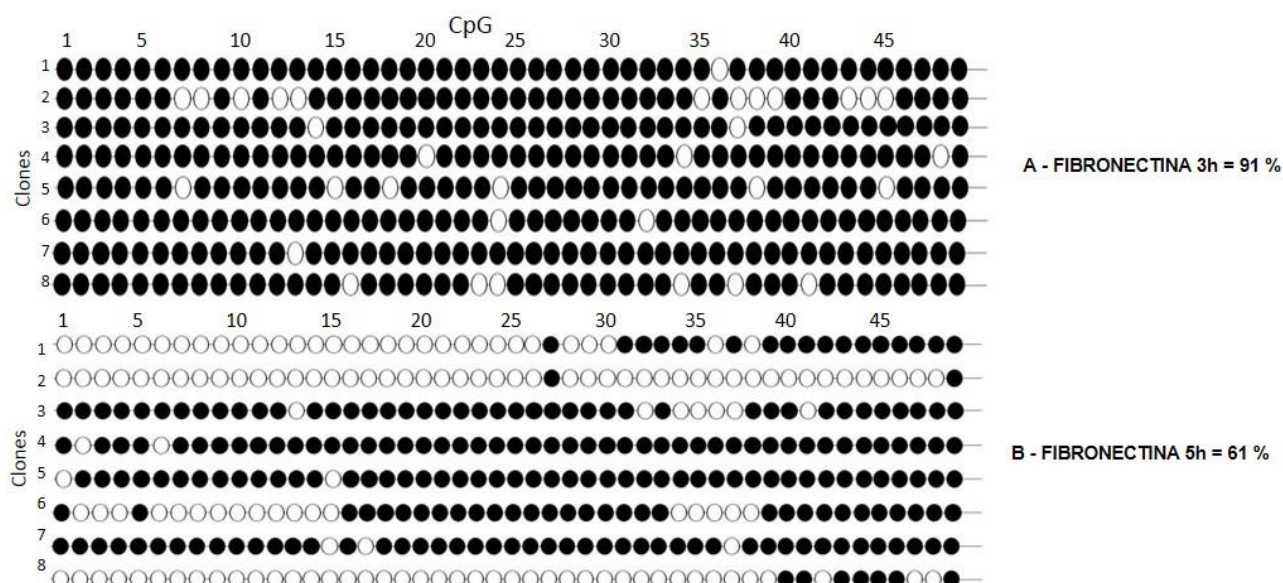


FIGURA 25 - PERFIL DE METILAÇÃO DA LINHAGEM MCF7 APÓS CULTIVO COM FIBRONECTINA.

A) Cultivo por 3h, B) Cultivo por 5h. Os clones estão alinhados paralelamente nas figuras, representado por cada linha contendo os círculos brancos e pretos. Cada dinucleotídeo (49) está representado por um círculo, sendo que os círculos fechados representam as citosinas metiladas, e os círculos brancos, ou abertos, as citosinas não metiladas. Os traços correspondem à CGs indeterminados quanto ao seu perfil de metilação. A numeração acima dos círculos corresponde à numeração dos CGs na ilha de CpG 2 sequenciada.

Os resultados de sequenciamento da linhagem MCF7 (Figura 21 - A) mostraram uma taxa de metilação global de 90%, enquanto nos cultivos com a proteína fibronectina por 3h a linhagem apresentou uma taxa de metilação global de 91% (Figura 25 - A), e, por 5h, a taxa de metilação global foi de 61% (Figura 25 - B). Portanto, estes resultados mostraram que a interação entre a linhagem e a fibronectina induziu a desmetilação do promotor do gene *MMP2* em torno de 30% após 5 horas de tratamento.

No gráfico abaixo é possível comparar o processo de desmetilação observado na linhagem MFC7 sob as diferentes condições de tratamentos testadas (Figura 26).

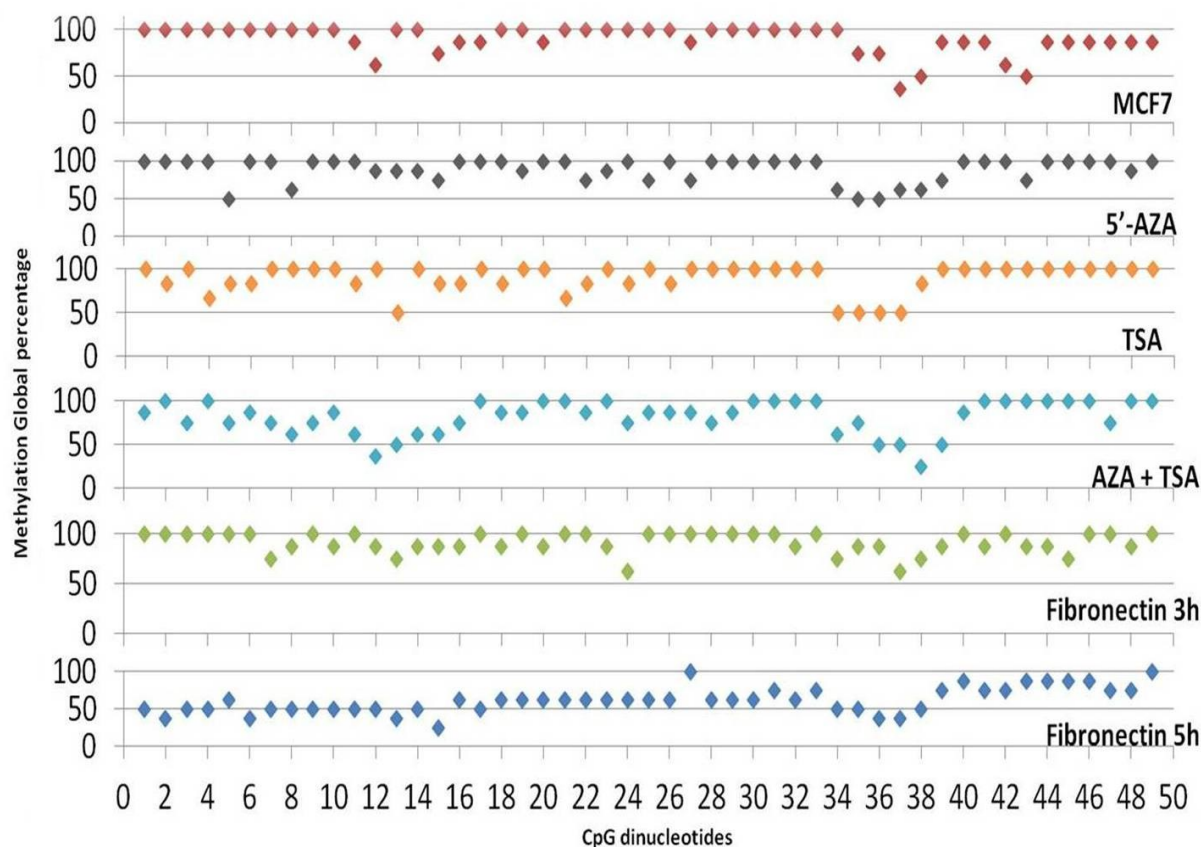


FIGURA 26 - PERCENTAGEM DE DESMETILAÇÃO APÓS OS TRATAMENTOS DA LINHAGEM MCF7. Cada ponto corresponde à percentagem de metilação do dinucleotídeo localizado nas posições descritas abaixo da figura. A linhagem controle (MCF7 sem tratamento) foi utilizada como comparação aos tratamentos listados abaixo (5-Aza, TSA, Aza+TSA, fibronectina 3 e 5h).

Perfil de metilação da linhagem MCF7 submetida aos tratamentos mostrou que, em geral, a linhagem MCF7 que não expressa *MMP2* apresentou a maioria dos dinucleotídeos CGs metilados, em pelo menos oito clones sequenciados, e esta característica lhe confere um perfil de metilação global de aproximadamente 90%. O tratamento com 5-Aza possibilitou a expressão de *MMP2*. Os dados obtidos com o sequenciamento mostraram que apenas houve desmetilação de alguns clones nos dinucleotídeos 8, 19, 22, 23, 25 e 34 a 36 e esta característica está relacionada com a expressão do gene.

Já o tratamento com o TSA demonstrou que alguns dinucleotídeos mostraram-se diferencialmente metilados (principalmente os CGs 4 e 13 quando comparados ao controle e ao tratamento com 5-Aza). Se for comparado apenas o tratamento com TSA ao tratamento com 5-Aza, obtém-se um diferencial de metilação em alguns dinucleotídeos (6, 8, 11, 16, 18, 19, 24, 25 a 27 e 39) sendo mais pronunciadas as proporções entre os nucleotídeos 13 e 21. Esta diferença de metilação denota que

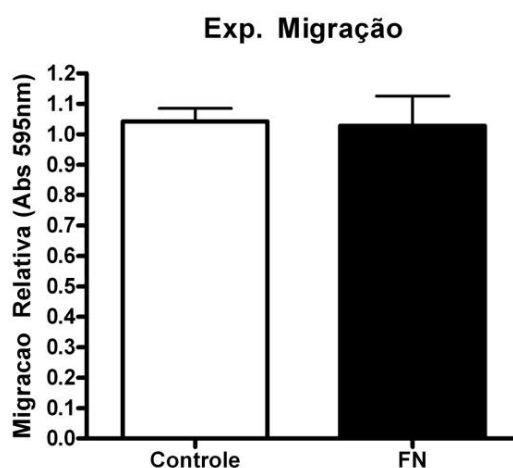
apenas as modificações estruturais proporcionadas pelo uso do TSA como inibidor de HDACs foram suficientes para que outros dinucleotídeos perdessem seu grupamento metil, conferindo um perfil de metilação diferente do perfil de metilação obtido com 5-Aza.

Os dados mais significativos, porém, provêm dos tratamentos realizados com a fibronectina por 5h. Observa-se uma redução acentuada na taxa de metilação global (30%) nesta condição de cultivo, sendo que nos dinucleotídeos 1 ao 38, exceto o 27, a metilação diminuiu 50%, estando ainda os dinucleotídeos 6 e 15 com taxas inferiores a este valor. Os dinucleotídeos restantes, dos 39 aos 49, mostraram um perfil semelhante ao da linhagem controle. Em todas as condições testadas, apenas o dinucleotídeo 49 não apresentou qualquer alteração, sugerindo que, a partir deste nucleotídeo não ocorram alterações estruturais capazes de interferir na expressão de *MMP2*.

5.4 POTENCIAL MIGRATÓRIO E INVASIVO DA LINHAGEM MCF7

Tendo em vista a expressão de *MMP2* e provavelmente de muitos outros genes após o cultivo com fibronectina, foi avaliado o potencial migratório de células cultivadas com fibronectina. Sabe-se que a linhagem MCF7 possui uma baixa capacidade invasiva (Johnson *et al.*, 1999, Torricelli *et al.*, 2006) e em ambos os modelos de migração ou invasão testados, as células foram inicialmente submetidas ao cultivo com a fibronectina por 5 h. Após o tempo de exposição, as células foram transferidas para uma superfície contendo colágeno e cultivadas nas condições padrões.

No ensaio de migração não foi possível observar a alteração da condição migratória das células de MCF7 controle e após o cultivo com fibronectina no tempo estipulado. Isto demonstra que o estímulo gerado pela interação entre a célula e a proteína fibronectina ainda não foi suficiente para modificar sua taxa de migração (Figura 26).



P = 0.44

FIGURA 27 – ENSAIO DE MIGRAÇÃO DA LINHAGEM MCF7 TRATADA COM FIBRONECTINA. Controle – MCF7 sem cultivo com a fibronectina, FN – MCF7 cultivada com fibronectina por 5 h ($p = 0.44$). Os resultados consistem de dois experimentos independentes.

Os ensaios de invasão utilizando a MCF7 cultivada com fibronectina também não demonstraram diferenças em relação ao controle, mesmo após 24, 48 ou 72 h de incubação (dados não mostrados).

Outro ensaio de invasão que mimetiza o micro-ambiente tumoral conhecido como MTS (*multicellular tumor spheroids*) ou culturas de matriz de colágeno 3D *in vitro* foi realizado (Ravanti *et al.*, 1999). O objetivo desta técnica foi avaliar se a formação do esferóide poderia promover a invasão da MCF7 que ainda estivesse expressando MMP-2. Para este ensaio as células de MCF7 foram cultivadas com fibronectina por 5 horas e depois transferidas para uma matriz de agarose por 72 horas para a formação do esferóide. Em seguida, os esferóides formados foram transferidos para uma matriz de colágeno contendo a fibronectina. As células foram acompanhadas durante sete dias para visualizar o seu potencial invasivo. A linhagem MDA-MB-435 que possui capacidade invasiva foi utilizada como controle (Figura 28).

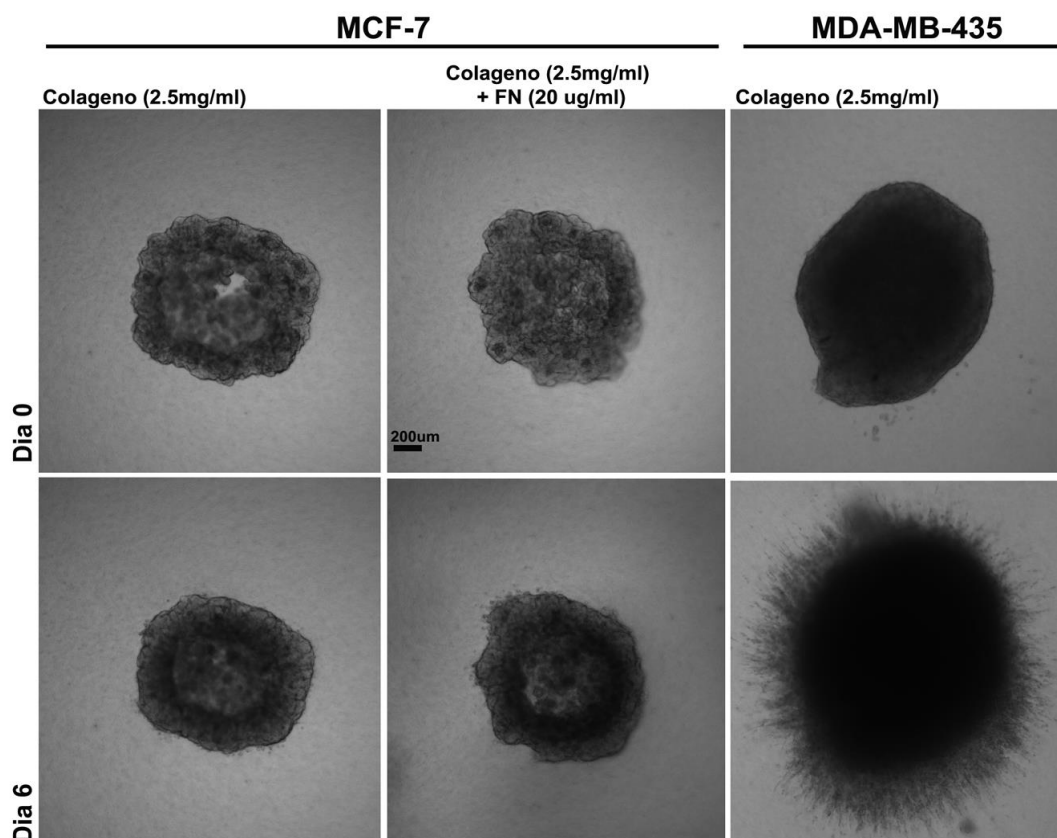


FIGURA 28 – ENSAIO DE MTS (*MULTICELLULAR TUMOR SPHEROIDS*) DA LINHAGEM MCF7 TRATADA COM FIBRONECTINA. Neste ensaio, a linhagem MCF7 foi tratada com fibronectina por 5 h e transferida para um arcabouço de agarose até a formação de um esferóide por 72 h. Em seguida, estes esferóides foram transferidos para um *coating* de colágeno contendo, ou não, fibronectina. A invasão do colágeno foi acompanhada por 7 dias. A linhagem MDA-MB-435 foi utilizada como controle por ser altamente invasiva.

Os resultados obtidos mostraram que a linhagem controle (MDA-MB-435) apresentou o aspecto filamentososo esperado indicando a invasão na matriz 3D, enquanto a linhagem MCF7 não adquiriu potencial invasivo após as condições testadas.

5.4.1 Efeito do recultivo da linhagem MCF7 tratada com fibronectina na metilação da ilha de CpG 2 do gene *MMP2*

Para avaliar se o efeito de desmetilação de *MMP2* se mantém sem a presença da fibronectina foi conduzido um experimento denominado recultivo. Neste ensaio, após a linhagem MCF7 ser cultivada com fibronectina por 5h, as células foram transferidas para uma nova garrafa sem a proteína e cultivadas sob condições padrão por 48h. Em seguida foram realizadas a análise de expressão por RT-PCR e sequenciamento da região promotora de *MMP2*. Na análise por sequenciamento foi

possível observar o restabelecimento da metilação da região estudada aumentando em 16% quando comparado com o cultivo com fibronectina por 5 h (Figura 29).

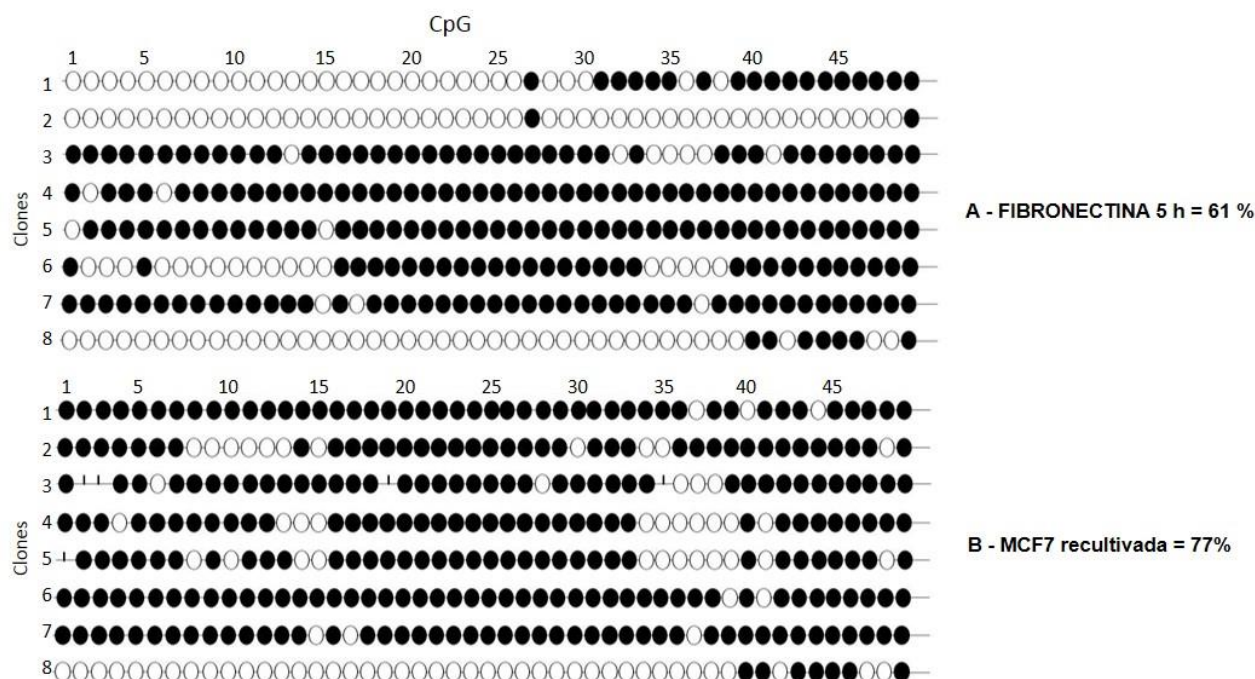


FIGURA 29 - PERFIL DE SEQUENCIAMENTO DA LINHAGEM MCF7 CULTIVADA COM FIBRONECTINA E RECVLTIVADA POR 48h SEM FIBRONECTINA. A) Cultivo com fibronectina por 5h (Igual a da figura 26 - colocada na figura para auxiliar a comparação do perfil de metilação observado), B) Cultivo em meio completo por 48h após a retirada do cultivo com fibronectina por 5h. Os círculos fechados correspondem aos dinucleotídeos CG metilados enquanto os abertos, aos não metilados.

Este resultado mostrou que após a retirada do estímulo (fibronectina), a região promotora de *MMP2* nas células de MCF7 passaram a metilar os dinucleotídeos outrora desmetilados, alcançando um perfil de metilação global de 61% para 77% no recultivo. Isto pode explicar a ausência de invasão da linhagem MCF7 após a retirada da fibronectina.

5.5 IMUNOPRECIPITAÇÃO DA CROMATINA

Para avaliar as possíveis modificações de histonas associadas a expressão de *MMP2* na linhagem cultivada com fibronectina, foi realizado ensaio de imunoprecipitação da cromatina com três anticorpos que sinalizam para a condição de cromatina inativa (H3K9me3, H3K27me3) e para a marcação de cromatina ativa

(H3K4me3). Para este ensaio, dois pares de iniciadores foram utilizados conforme a literatura, nomeados de B1 e B2² (Chernov *et al.*, 2009) (Figura 30).



FIGURA 30 – LOCALIZAÇÃO DOS INICIADORES PARA A REAÇÃO DE qPCR DA ChIP. Localização dos iniciadores utilizados no ensaio em relação à região promotora de *MMP2* (B1 e B2). As sequências dos iniciadores podem ser visualizadas no documento em anexo.
Fonte: Adaptado de Chernov *et al.*, 2009.

O resultado de qPCR em relação ao controle endógeno *GAPDH* está mostrado a seguir (Figura 31).

O controle positivo H3 manteve-se semelhante entre a linhagem controle e a linhagem cultivada com fibronectina. As marcas de histonas correspondentes ao silenciamento - H3K9me3, H3K27me3 – não mostraram mudanças entre o controle e o tratamento na condição experimental testada (Figura 31). Por outro lado o padrão de modificação de histona correspondente à cromatina aberta - H3K4me3 - da região promotora de *MMP2* foi alterado significativamente entre o cultivo controle e o tratado com fibronectina (Figura 31).

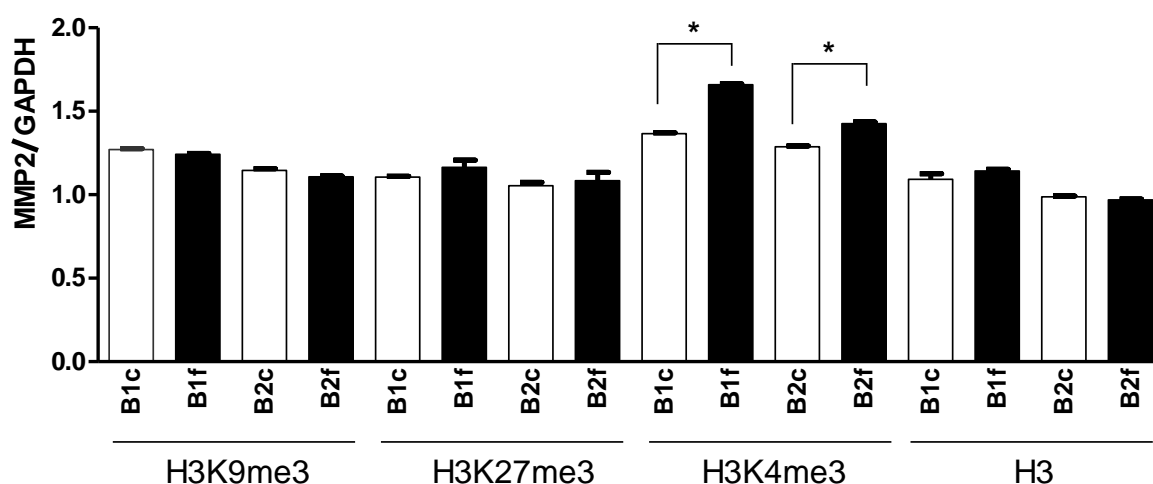


FIGURA 31 – RESULTADO DE qPCR DA ChIP. Valores de Ct normalizados entre o tratamento e o controle (*MMP2/GAPDH*). Em branco estão os valores de Ct obtidos a partir do controle (MCF7 sem fibronectina - c) e em preto estão os valores de Ct normalizados a partir do tratamento (MCF7 cultivada com fibronectina). Embaixo da figura as amostras estão

3 a sequência dos iniciadores pode ser conferida nos anexos, bem como a sua localização.

separadas de acordo com o anticorpo utilizado na imunoprecipitação. B1 e B2 correspondem à região de análise da região promotora do gene *MMP2*, conforme a figura 30. * Valores significativos $p < 0,001$, ANOVA.

Estes resultados também sugerem uma tênue linha de tendência para eucromatina no tratamento com fibronectina, no entanto, este evento é precoce nas condições experimentais testadas.

6 DISCUSSÃO

Cerca de 90% das causas de mortes por câncer de mama são em decorrência das metástases (Sporn, 1996; Duffy, 2005; Sethi & Kang, 2011) e dentre os diversos grupos de genes que podem ser ativados ou silenciados no processo de migração e instalação destas células destacam-se as metaloproteases, especialmente a MMP-2. Sabe-se que uma vez em cultura, a fibronectina é capaz de promover a expressão de MMP-2 na linhagem tumoral de mama MCF7 (Das *et al.*, 2008; Moroz *et al.*, 2013), por outro lado, também já foi demonstrado que este gene possui regulação por mecanismos epigenéticos (Chernov *et al.*, 2009, Chik & Szyf, 2010). Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar se a ativação do gene *MMP2* na linhagem tumoral de mama MCF7 poderia estar ocorrendo por mecanismos epigenéticos especificamente por desmetilação da região promotora.

Utilizando um painel de linhagens celulares de mama foram identificadas diferenças de expressão do gene *MMP2*. Resultados de RT-PCR (Figura 18) mostraram que as linhagens HB4a, HB4aC3.6, MDA-MB-231, MDA-MB-435, MDA-MB-436, SKBR3 e PMC42 expressam *MMP2*, enquanto a linhagem MCF7 não expressam o gene. As análises por sequenciamento confirmam os dados de expressão sendo que as linhagens que expressam o gene tem baixa densidade de metilação e vice-versa (Figura 19). Estes resultados também mostraram que não é possível distinguir regiões diferencialmente metiladas entre as linhagens que expressam ou não o gene *MMP2*, impossibilitando a análise por PCR metilação específica (MSP) de amostras tumorais. Para validar esta teoria, a região promotora do gene *MMP2* foi sequenciada em tumores que expressam e não expressam a proteína e mostram que as amostras tumorais com imunohistoquímica positiva para MMP-2 apresentaram perfil de metilação semelhante a linhagem MCF7, confirmando assim, a impossibilidade de aplicação da técnica de MSP para avaliar a metilação do DNA deste gene em tumores primários de mama (Ramos *et al.*, 2013 em fase de submissão).

Para confirmar a regulação da expressão do gene *MMP2* por metilação do DNA (Chernov *et al.*, 2009) e também para testar as condições laboratoriais, a linhagem MCF7 foi tratada isoladamente com 5-Aza (5-aza-2'-deoxicitidina) e TSA (Tricostatin A), e simultaneamente com ambos os agentes. O cultivo com 5-Aza demonstrou que a linhagem MCF7 passou a expressar o gene *MMP2* e este resultado está de acordo

com a literatura (Figura 19). Os resultados obtidos a partir dos tratamentos com 5-Aza e TSA na expressão do gene *MMP2*, sugerem que os efeitos na transcrição gênica são decorrentes tanto da metilação do DNA quanto na desacetilação de histonas como já sido sugerido previamente por outros autores (Chernov *et al.*, 2009).

A confirmação da desmetilação do promotor de *MMP2* foi feita através do sequenciamento e, embora ocorra expressão de *MMP2* após o tratamento com o 5-Aza, o nível de desmetilação foi discreto, em torno de 5% (Figura 21 B) com destaque para os CpGs 34 a 37. Recentemente um estudo relatou aumento nos níveis de RNAm de *MMP2* após o tratamento com 5-Aza, tendo sido observado também pouca desmetilação de uma região contendo 5 CpGs a 5' da região do nosso estudo (Chik & Szyf, 2010).

Tem sido relatado a possibilidade de desmetilação direcionada de um único sítio CpG da região promotora do gene *IL-2*, em que ocorre uma rápida ativação da expressão do gene, sendo inclusive, um processo reversível (Murayama *et al.*, 2006).

Já o efeito de TSA sobre cultivo de MCF7 mostrou que a atividade da *MMP2* também pode ser regulada pelas histonas deacetilases (HDACs) (Figura 20). Foi possível observar que o tratamento com TSA promoveu a desmetilação de alguns dinucleotídeos CpGs diferentes dos CpGs desmetilados quando a linhagem foi tratada apenas com 5-Aza (Figura 21 C), embora uma região tenha se mantido constante em ambas condições testadas (CGs 34 ao 38).

O tratamento concomitante com 5-Aza e TSA, por outro lado, mostrou que a desmetilação CpG direcionada de outros CGs poderiam constituir prováveis locais de ligação de fatores de transcrição importantes no controle da expressão de *MMP2* (Figura 21 D). Para verificar esta possibilidade, a região promotora contendo a ilha de CpG 2 do gene *MMP2* foi submetida à análise dos fatores de transcrição (mostrados no anexo). Esta análise permitiu verificar que sobre os CGs 33 a 37 há sítios de ligação para um grupo de proteínas denominadas de PRDM que desempenham um papel importante na regulação da expressão gênica, modificando a estrutura da cromatina através da atividade metiltransferase ou através do recrutamento de complexos de remodelação da cromatina (Di Zazzo *et al.*, 2013). Contudo, ensaios adicionais seriam necessários para verificar a efetiva ligação de tais complexos à sequência promotora do gene *MMP2*.

O cultivo com os agentes 5-Aza e TSA comprovam que a expressão do gene *MMP2* é decorrente tanto da metilação do DNA quanto da desacetilação de histonas na linhagem MCF7 e que, aparentemente, a metilação do DNA sozinha, não é capaz de silenciar *MMP2* sem a ação concomitante das modificações das histonas dados similares aos descritos por Chernov *et al.* (2009).

Estudos envolvendo a interação do microambiente vs célula tumoral descrevem que o cultivo com a fibronectina em apenas uma hora e de modo dose-dependente é capaz de promover a expressão e secreção de MMP-2 pela célula tumoral MCF7 (Das *et al.*, 2008). Nossos dados de cultivo celular em meio contendo fibronectina mostraram também a expressão do gene *MMP2* por RT-PCR (Figura 22). Além disso a quantificação dessa expressão por qPCR mostrou que todos os tratamentos realizados apresentaram valores significativamente maiores do resultado obtido com a MCF7 sem tratamento (Figura 23). Além disso todos os tratamentos efetuados (5-Aza, TSA, 5-Aza +TSA e fibronectina por 5 horas) foram capazes de produzir a MMP-2 ativa em zimografia (Figura 24). O sequenciamento da região promotora de *MMP2* após o cultivo com a fibronectina por 3h mostrou que não ocorreu uma desmetilação promotora do gene (Figura 25 A). Porém, o tratamento com 5 h provocou uma desmetilação em torno de 30% maior do que o observado com qualquer outro tratamento (Figura 25 B). Até o presente momento, a desmetilação observada em promotores de genes foi somente identificada mediante a utilização de algum composto químico inibidor de enzimas (Murayama *et al.*, 2006; Milutinovic *et al.*, 2007; Chik & Szyf, 2010). Portanto, esta é a primeira vez na literatura que é relatado a desmetilação de um gene envolvido com metástases através da interação celular com um único componente da matriz extracelular.

A matriz extracelular (MEC), ou o microambiente no qual as células estão inseridas, é composta por uma rede de moléculas, tais como o colágeno e elastina, glicoproteínas como a laminina, proteoglicanos hidrofílicos e fibronectina em baixas quantidades (Lelièvre, 2009). Em tumores de mama, por outro lado, um aumento na quantidade de fibronectina está correlacionado com a severidade da doença (Ioachim *et al.*, 2002; Helleman *et al.*, 2008). A transição epitelial-mesenquimal (TEM) trata-se de uma conversão fenotípica que ocorre durante o desenvolvimento embrionário, remodelamento tecidual e é essencial para o surgimento das metástases (Polyak & Weinberg, 2009). A TEM é um processo dinâmico e reversível que pode ocorrer nas células situadas na borda de tumores. Este processo é provocado por sinais recebidos

por essas células em seu microambiente, tais como TGF β , Wnt e TNF α (Miettinen *et al.*, 1994; Kalluri & Weinberg, 2009; Dong *et al.*, 2012) e recentemente foi proposto que a fibronectina possui um papel essencial no estabelecimento da TEM (Park & Schwarzbauer, 2013). Assim sendo, os resultados de desmetilação do gene *MMP2* após o cultivo com a fibronectina revelam uma parte muito importante do processo de formação de metástases correlacionada com a expressão desta metaloprotease.

A interação com fibronectina poderia levar à MCF7 a aumentar a sua taxa de migração uma vez que na literatura já é bem descrita que a linhagem MCF7 possui uma baixa taxa migratória (Hurtubise & Momparker, 2006; Figueira *et al.*, 2009). Outros modelos tumorais descrevem o aumento da migração mediada pela expressão de MMP-2, em células de câncer de ovário ou de pulmão, baseados na interação com fibronectina (Kenny *et al.*, 2008; Meng *et al.*, 2009). Ensaio de migração e invasão foram realizados com a linhagem MCF7 cultivada com fibronectina para verificar se a expressão de *MMP2* poderia alterar o padrão migratório. A linhagem MCF7 quando cultivada com fibronectina não mostrou alterações neste padrão em relação à linhagem controle (Figura 27), bem como não foi observado nenhuma modificação no processo invasivo destas células (não mostrado). Para avaliar se a manutenção permanente do estímulo poderia promover a invasão da MCF7, um ensaio de mimetização do micro-ambiente tumoral conhecido como MTS (*multicellular tumor spheroids*) foi realizado. Este ensaio assemelha-se a tumores *in vivo* através do estabelecimento de gradientes de oxigênio e nutrientes, resultando em células ativas e invasivas mesmo se quiescentes ou em estágios de necrose no interior do esferóide (Smalley *et al.*, 2006; Lin *et al.*, 2008). Neste ensaio, a fibronectina foi adicionada ao substrato após as 72 h de formação do esferóide e seu potencial invasivo foi acompanhado durante sete dias. No entanto, nenhuma invasão foi observada (Figura 28) demonstrando que, embora o estímulo (fibronectina) fosse colocado junto à matriz de colágeno, o modelo proposto ainda não foi suficiente para tornar a MCF7 uma célula invasiva.

Após ter sido verificada a ausência de migração/invasão pela MCF7, buscou-se avaliar se a retirada do estímulo induzido pela fibronectina seria o suficiente para provocar algum efeito na metilação do promotor do gene *MMP2*. Para isso, foi realizado o cultivo da linhagem MCF7 por 5h com a fibronectina seguido do recultivo por 48h nas condições habituais de cultura sem a fibronectina. O sequenciamento da região promotora de *MMP2* mostrou um processo de metilação com aumento em torno

de 16% de alguns CpGs outrora desmetilados (Figura 29). A expressão de *MMP2* diminuiu sob esta condição e os resultados sugerem que os dinucleotídeos mais importantes na manutenção da expressão deste gene nesta condição seriam os CGs 15, 34, 35, 36, 38, 39 (50% desmetilado) e 37 (75% de desmetilação) (Figura 29). Este dado reforça que o processo de desmetilação de *MMP2* é um processo é dinâmico, rápido e transitório, e que, uma vez retirado o estímulo, o gene foi passível de re-metilação. Este dado corrobora, portanto, o motivo pelo qual a célula foi incapaz de migrar ou invadir nos ensaios realizados, uma vez que não havia o estímulo necessário para produzir este efeito.

Ensaio de imunoprecipitação da cromatina (ChIP) foram realizados com a linhagem cultivada com fibronectina e a controle para verificar se haviam modificações de histonas mediante a expressão de *MMP2* nas condições testadas. Os anticorpos escolhidos para este experimento constituíam situações em que a cromatina estivesse fechada (H3K27me3 e H3K9me3) ou aberta (H3K4me3). Os resultados de qPCR do ChIP da região promotora de *MMP2* após o cultivo com fibronectina mostraram que as quantidades de H3, H3K27me3 e H3K9me3 se mantiveram inalteradas quando comparadas ao controle. Porém, a marca de histona de abertura para transcrição mostrou um aumento estatisticamente significativo (Figura 31). Estes dados podem indicar que o tempo de tratamento de 5h com a fibronectina foi suficiente para que alguns CpGs desmetilados pudessem refletir na expressão do gene *MMP2* na linhagem MCF7. Como foi observado um discreto aumento na histona associada à condição de eucromatina, talvez um tempo de tratamento mais prolongado pudesse proporcionar a diminuição das marcas de heterocromatina, uma desmetilação do promotor mais intensa e dessa forma a expressão do gene *MMP2* passasse a ser herdável.

Há dados que mostram que a linhagem MCF7 possui elevados níveis de H3K4me2 na região promotora do gene *MMP2* e esta característica seria importante para a rápida ativação da transcrição do gene (Chernov *et al.*, 2009). E que a presença de H3K27me3 é capaz de promover a rápida metilação do gene da E-caderina (*CDH1*) também importante na transição epitelial-mesenquimal no processo de metástases (Dong *et al.*, 2012). Além disso, tem sido proposto que a desmetilação do DNA de certos genes apresentam um sincronismo entre as perdas das marcas de metilação das histonas, neste caso de H3K27me3, e com o ganho de marcas de acetilação na lisina 9 da H3 (H3K9ac) (McGarvey *et al.*, 2006; Hinshelwood *et al.*, 2009, Dong *et al.*,

2012). Deste modo, é possível sugerir que a presença de H3K27me3 seria uma marca imprescindível para a rápida metilação de *MMP2*, assim como as marcas de H3K4me2 para a rápida desmetilação, como já descrito por Chernov (2009). No entanto, novos tempos de cultivos com mais anticorpos seriam necessários para comprovar esta característica.

As vias de sinalização que podem estar envolvidas na presença de MMP-2 durante o cultivo com a fibronectina devem ser consideradas nesta análise. Sabe-se que macromoléculas da MEC influenciam a expressão de MMPs e este processo é mediado por receptores de integrinas (Arner & Tortorella, 1995). As integrinas desempenham um papel importante no processo fisiológico e a sua interação na superfície celular, em vias gerais, promove aumento na fosforilação da via FAK (Kornberg *et al.*, 1991) que se liga a uma série de proteínas estruturais e sinalizadoras, que combinadas ativam a fosfatidil inositol-3-quinase (PI-3-quinase). Autores também relatam a ativação da proteína Ras e da cascata quinase de Raf-1, MEK e ERK nesta sinalização (Juliano, 2002). Na literatura têm-se relatado que as vias PI-3K e ERK regulam a expressão de MMP-2 (Juliano, 2002; Zhang *et al.*, 2004) e que o impedimento da ativação da ERK inibe a atividade do promotor de MMP-2 (Pan *et al.*, 2002). No entanto, é descrito que em linhagens de mama, a ligação entre a fibronectina e as subunidades de integrinas $\alpha 5\beta 1$ na superfície celular são as responsáveis pela expressão do gene *MMP2* (Das *et al.*, 2008). Propõem-se aqui, que a fibronectina seria um fator, presente no microambiente tumoral, capaz de sinalizar à célula o processo de ativação destas vias, contribuindo para a desmetilação da região promotora de *MMP2* e consequente expressão do gene.

Existe uma extensa discussão a respeito de qual mecanismo epigenético seria o maior responsável pela ausência da expressão de certos genes. Um dos modelos bem estabelecidos é descrito para o gene *PGR* que é regulado pela presença do receptor de estrógeno em câncer de mama. Autores descrevem que a ausência do receptor de estrógeno nas células mamárias, por silenciamento do gene *ESR1*, por exemplo, leva ao recrutamento de proteínas *polcomb* e de HDACs na região promotora do gene *PGR*. Este complexo repressor ali instalado, recruta as DNMTs que metilam os CpGs situados na região adjacente e ao longo do tempo esta característica torna-se herdável, inibindo a expressão de *PGR* (Leu *et al.*, 2004). Este mesmo modelo foi proposto para o gene *p16^{INK4A}* em que a metilação do gene ocorre após a instalação das marcas de histonas repressoras na região promotora

(Hinsehelwood *et al.*, 2009). Por outro lado, o gene *CDH1*, que produz o transcrito E-caderina, uma proteína também essencial na transição epitelial-mesenquimal, apresenta um modelo de regulação oposto. Neste gene a metilação do DNA precede às modificações de histonas na região promotora e esta característica estaria relacionada a um processo reversível (Dong *et al.*, 2012).

O que se observa com o gene *MMP2* diante do ensaio proposto é que, as marcas de histonas auxiliariam na proteção da metilação do gene garantindo sua inativação, no entanto, estas marcas não seriam as responsáveis pelo processo de desmetilação. Assim, ao que parece até agora, a desmetilação dinâmica na região promotora de *MMP2* e consequente expressão do gene é um processo ativo e rápido, e esta é a primeira evidência descrita de que uma molécula constituinte do microambiente tumoral foi capaz de induzir um processo de desmetilação de um gene que está associado à progressão de tumores. Deste modo pode-se inferir que a metilação do gene *MMP2* na linhagem tumoral de mama MCF7 ocorre antes das modificações nas histonas ali presentes e é esta característica que garante a ausência da expressão de *MMP2* neste modelo experimental.

Um desenho do modelo experimental foi proposto e pode ser visto na Figura 32 após a conclusão.

7 CONCLUSÃO

O gene *MMP2* na linhagem MCF7 é silenciado por metilação do DNA e por modificações das histonas, e o contato das células com a proteína fibronectina foi capaz de ativar o gene produzindo a proteína ativa. Nesse trabalho foi evidenciado que, durante o processo de ativação, ocorre a desmetilação de uma região do promotor do gene *MMP2*, e este é o primeiro relato na literatura envolvendo a ativação epigenética, especificamente pelo efeito desmetilante do DNA de uma proteína da matriz extracelular. Estudos posteriores em tumores de mama poderão confirmar esse efeito e no futuro talvez sejam desenvolvidas novas abordagens terapêuticas baseadas nesses mecanismos.

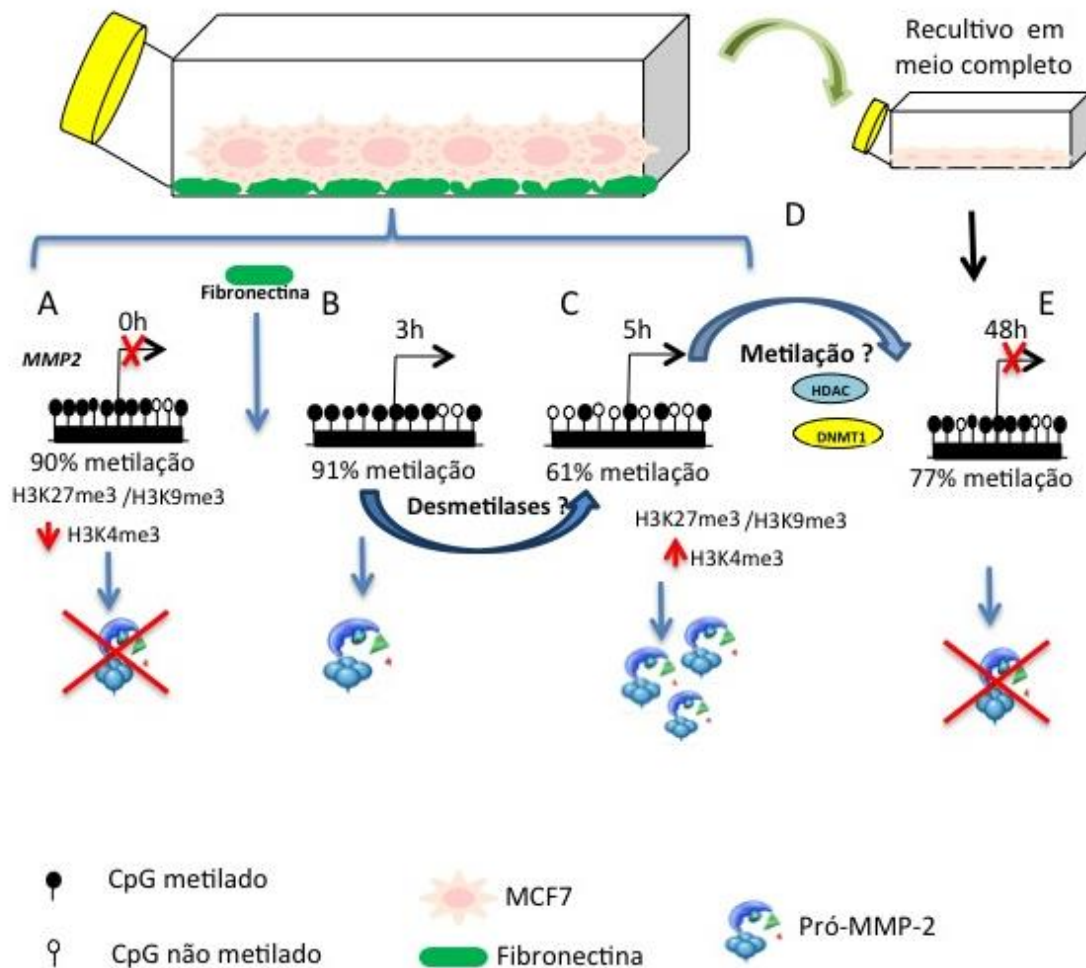


FIGURA 32 - MODELO DE ATIVAÇÃO DO GENE *MMP2* PELA FIBRONECTINA EM CÉLULAS MCF7.

O modelo mostra o cultivo celular da linhagem MCF7: **A** representa o tempo 0 em que o promotor está 90% metilado e as marcas de histonas de repressão K27 e K9 estão presentes, e a marca de histona de ativação K4 está reduzida. Dessa forma não há expressão da *MMP2*. Em seguida em **B**, as células encontram-se em meio contendo fibronectina por 3 h, o promotor continua metilado, porém, já pode-se observar a expressão de pequenas quantidades de *MMP2*. Em **C**, após 5 h de cultivo ocorreu a desmetilação de aproximadamente 30% do promotor do gene *MMP2*, sendo que pode-se observar quantidades maiores da enzima *MMP-2* bem como o aumento discreto da marca de ativação histona K4. Em **D** as células tratadas por 5 h com fibronectina foram recolocadas em cultivo em meio isento da proteína de matriz. Em **E** observa-se que ocorreu a remetilação do promotor do gene *MMP2*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ACOSTA-SILVA, C., BRANCHADELL, V., BERTRAN, J., OLIVA A. Mutual relationship between stacking and hydrogen bonding in DNA. Theoretical study of guanine-cytosine, guanine-5-methylcytosine, and their dimers. **J Phys Chem B**. 2010 Aug 12;114 (31):10217-27.
- AKIYAMA, S. K., KOLDEN, K., *et al.* Fibronectin and integrins in invasion and metastasis. **Cancer Metastasis Rev**, v.14, n.3, Sep, p.173-89. 1995.
- AL-RAAWI, D., ABU-EL-ZAHAB, H., *et al.* Membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) correlates with the expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) in inflammatory breast cancer. **Int J Clin Exp Med**, v.4, n.4, p.265-75. 2011.
- AMBROS, V. The functions of animal microRNAs. **Nature**, v.431, n.7006, Sep 16, p.350-5. 2004.
- AMIR, R. E., VAN DEN VEYVER, I. B., *et al.* Influence of mutation type and X chromosome inactivation on Rett syndrome phenotypes. **Ann Neurol**, v.47, n.5, May, p.670-9. 2000.
- ANDERSON, J. D., WIDOM, J. Sequence and position-dependence of the equilibrium accessibility of nucleosomal DNA target sites. **J Mol Biol**, v.296, n.4, Mar 3, p.979-87. 2000.
- ANTEQUERA, F. Structure, function and evolution of CpG island promoters. **Cell Mol Life Sci**, v.60, n.8, Aug, p.1647-58. 2003.
- ARNER, E. C., TORTORELLA, M. D. Signal transduction through chondrocyte integrin receptors induces matrix metalloproteinase synthesis and synergizes with interleukin-1. **Arthritis Rheum**, v.38, n.9, Sep, p.1304-14. 1995.
- ARPINO, G., GREEN, S. J., *et al.* HER-2 amplification, HER-1 expression, and tamoxifen response in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer: a southwest oncology group study. **Clin Cancer Res**, v.10, n.17, Sep 1, p.5670-6. 2004.
- ATTWOOD, J. T., YUNG, R. L., *et al.* DNA methylation and the regulation of gene transcription. **Cell Mol Life Sci**, v.59, n.2, Feb, p.241-57. 2002.
- BAKER, A. H., AHONEN, M., *et al.* Potential applications of tissue inhibitor of metalloproteinase (TIMP) overexpression for cancer gene therapy. **Adv Exp Med Biol**, v.465, p.469-83. 2000.
- BANNISTER, A. J., KOUZARIDES, T. Regulation of chromatin by histone modifications. **Cell Res**, v.21, n.3, Mar, p.381-95. 2011.
- BARBOLINA, M. V., STACK, M. S. Membrane type 1-matrix metalloproteinase: substrate diversity in pericellular proteolysis. **Semin Cell Dev Biol**, v.19, n.1, Feb, p.24-33. 2008.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, v.136, n.2, Jan 23, p.215-33. 2009.
- BAYLIN, S. B., JONES, P. A. A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. **Nat Rev Cancer**, v.11, n.10, Oct, p.726-34. 2011.
- BERNARDO, M. M., FRIDMAN, R. TIMP-2 (tissue inhibitor of metalloproteinase-2) regulates MMP-2 (matrix metalloproteinase-2) activity in the extracellular environment after pro-MMP-2 activation by MT1 (membrane type 1)-MMP. **Biochem J**, v.374, n.Pt 3, Sep 15, p.739-45. 2003.
- BERNSTEIN, B. E., HUMPHREY, E. L., *et al.* Methylation of histone H3 Lys 4 in coding regions of active genes. **Proc Natl Acad Sci**, v.99, n.13, Jun 25, p.8695-700. 2002.
- BHAUMIK, S. R., SMITH, E., *et al.* Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis. **Nat Struct Mol Biol**, v.14, n.11, Nov, p.1008-16. 2007.

- BIRD, A. The essentials of DNA methylation. **Cell**, v.70, n.1, Jul 10, p.5-8. 1992.
- _____. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes Dev**, v.16, n.1, Jan 1, p.6-21. 2002.
- BOLDEN, J. E., PEART, M. J., *et al.* Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. **Nat Rev Drug Discov**, v.5, n.9, Sep, p.769-84. 2006.
- BRACKE, M.E., VAN ROY, F.M., MAREEL, M.M. The E-cadherin/catenin complex in invasion and metastasis. **Curr Top Microbiol Immunol**. 213 (Pt 1):123-61. 1996.
- BRANCO, M. R., FICZ, G., *et al.* Uncovering the role of 5-hydroxymethylcytosine in the epigenome. **Nat Rev Genet**, v.13, n.1, Jan, p.7-13. 2011.
- CANCELLO, G., MAISONNEUVE, P., *et al.* Progesterone receptor loss identifies Luminal B breast cancer subgroups at higher risk of relapse. **Ann Oncol**, v.24, n.3, Mar, p.661-8. 2012.
- CAO, J., SATO, H., *et al.* The C-terminal region of membrane type matrix metalloproteinase is a functional transmembrane domain required for pro-gelatinase A activation. **J Biol Chem**, v.270, n.2, Jan 13, p.801-5. 1995.
- CHANG, C., WERB, Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. **Trends Cell Biol**, v.11, n.11, Nov, p.S37-43. 2001.
- CHEN, T., HEVI, S., *et al.* Complete inactivation of DNMT1 leads to mitotic catastrophe in human cancer cells. **Nat Genet**, v.39, n.3, Mar, p.391-6. 2007.
- CHERNOV, A. V., SOUNNI, N. E., *et al.* Epigenetic control of the invasion-promoting MT1-MMP/MMP-2/TIMP-2 axis in cancer cells. **J Biol Chem**, v.284, n.19, May 8, p.12727-34. 2009.
- CHESKIS, B. J., GREGER, J. G., *et al.* Signaling by estrogens. **J Cell Physiol**, v.213, n.3, Dec, p.610-7. 2007.
- CHIK, F., SZYF, M. Effects of specific DNMT gene depletion on cancer cell transformation and breast cancer cell invasion; toward selective DNMT inhibitors. **Carcinogenesis**, v.32, n.2, Feb, p.224-32. 2010.
- COLLINS, V. P. Breast cancer: the influence of treatment that fails to cure. **Cancer**, v.9, n.6, Nov-Dec, p.1177-81. 1956.
- COSTA, F.F., PAIXÃO, V.A., CAVALHER, F.P., *et al.* SATR-1 hypomethylation is a common and early event in breast cancer. **Cancer Genet Cytogenet**. Mar;165(2):135-43. 2006.
- COSTA, F.F. Non-coding RNAs: could they be the answer? **Brief Funct Genomics**. Sep;10(5):316-9. 2011.
- COSTA, V., APRILE, M., *et al.* RNA-Seq and human complex diseases: recent accomplishments and future perspectives. **Eur J Hum Genet**, Jun 27. 2012.
- COUSSENS, L. M., WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v.420, n.6917, Dec 19-26, p.860-7. 2002.
- CURRAN, S., DUNDAS, S. R., *et al.* Matrix metalloproteinase/tissue inhibitors of matrix metalloproteinase phenotype identifies poor prognosis colorectal cancers. **Clin Cancer Res**, v.10, n.24, Dec 15, p.8229-34. 2004.
- DAHL, C., GRONBAEK, K., *et al.* Advances in DNA methylation: 5-hydroxymethylcytosine revisited. **Clin Chim Acta**, v.412, n.11-12, May 12, p.831-6. 2011.
- DAS, S., BANERJI, A., *et al.* Rapid expression and activation of MMP-2 and MMP-9 upon exposure of human breast cancer cells (MCF-7) to fibronectin in serum free medium. **Life Sci**, v.82, n.9-10, Feb 27, p.467-76. 2008.

- DECLERCK, Y. A., MERCURIO, A. M., *et al.* Proteases, extracellular matrix, and cancer: a workshop of the path B study section. **Am J Pathol**, v.164, n.4, Apr, p.1131-9. 2004.
- DERYUGINA, E. I., QUIGLEY, J. P.. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. **Cancer Metastasis Rev**, v.25, n.1, Mar, p.9-34. 2006.
- DI ZAZZO, E., DE ROSA, C., *et al.* PRDM Proteins: Molecular Mechanisms in Signal Transduction and Transcriptional Regulation. **Biology**, v.2, 2013, p.107-141. 2013.
- DION, M. F., ALTSCHULER, S. J., *et al.* Genomic characterization reveals a simple histone H4 acetylation code. **Proc Natl Acad Sci**, v.102, n.15, Apr 12, p.5501-6. 2005.
- DOHERTY, L. F., BROMER, J. G., *et al.* In utero exposure to diethylstilbestrol (DES) or bisphenol-A (BPA) increases EZH2 expression in the mammary gland: an epigenetic mechanism linking endocrine disruptors to breast cancer. **Horm Cancer**, v.1, n.3, Jun, p.146-55. 2010.
- DONG, C., WU, Y., *et al.* G9a interacts with Snail and is critical for Snail-mediated E-cadherin repression in human breast cancer. **J Clin Invest**, v.122, n.4, Apr 2, p.1469-86. 2012.
- DROOG, M., BEELEN, K., *et al.* Tamoxifen resistance: From bench to bedside. **Eur J Pharmacol**, Mar 29. 2013.
- DUFFY, M. J., MAGUIRE, T. M., *et al.* Metalloproteinases: role in breast carcinogenesis, invasion and metastasis. **Breast Cancer Res**, v.2, n.4, p.252-7. 2000.
- DUFFY, S. W. Some current issues in breast cancer screening. **J Med Screen**, v.12, n.3, p.128-33. 2005.
- DUNNWALD, L. K., ROSSING, M. A., *et al.* Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. **Breast Cancer Res**, v.9, n.1, p.R6. 2007.
- DUONG, V., BRET, C., *et al.* Specific activity of class II histone deacetylases in human breast cancer cells. **Mol Cancer Res**, v.6, n.12, Dec, p.1908-19. 2008.
- DWORKIN, A. M., HUANG, T. H., *et al.* Epigenetic alterations in the breast: Implications for breast cancer detection, prognosis and treatment. **Semin Cancer Biol**, v.19, n.3, Jun, p.165-71. 2009.
- EGEBLAD, M., WERB, Z.. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat Rev Cancer**, v.2, n.3, Mar, p.161-74. 2002.
- EHRlich, R. Signals of genetic organization and regulation]. **Biochimie**, v.64, n.3, Mar, p.III-X. 1982.
- ESPARZA, J., VILARDELL, C., *et al.* Fibronectin upregulates gelatinase B (MMP-9) and induces coordinated expression of gelatinase A (MMP-2) and its activator MT1-MMP (MMP-14) by human T lymphocyte cell lines. A process repressed through RAS/MAP kinase signaling pathways. **Blood**, v.94, n.8, Oct 15, p.2754-66. 1999.
- ESTELLER, M. Epigenetic lesions causing genetic lesions in human cancer: promoter hypermethylation of DNA repair genes. **Eur J Cancer**, v.36, n.18, Dec, p.2294-300. 2000.
- _____. Epigenetic gene silencing in cancer: the DNA hypermethylome. **Hum Mol Genet**, v.16 Spec No 1, Apr 15, p.R50-9. 2007.
- FANJUL-FERNANDEZ, M., FOLGUERAS, A. R., *et al.* Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. **Biochim Biophys Acta**, v.1803, n.1, Jan, p.3-19. 2009.
- FASSINA, G., FERRARI, N., *et al.* Tissue inhibitors of metalloproteases: regulation and biological activities. **Clin Exp Metastasis**, v.18, n.2, p.111-20. 2000.

FEINBERG, A. P., VOGELSTEIN, B. Hypomethylation of ras oncogenes in primary human cancers. **Biochem Biophys Res Commun**, v.111, n.1, Feb 28, p.47-54. 1983.

FIDLER, I. J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. **Nat Rev Cancer**, v.3, n.6, Jun, p.453-8. 2003.

FIGUEIRA, R. C., GOMES, L.R., *et al.* Correlation between MMPs and their inhibitors in breast cancer tumor tissue specimens and in cell lines with different metastatic potential. **BMC Cancer**, v.9, p.20. 2009.

FORGET, M. A., DESROSIERS, R. R., *et al.* Physiological roles of matrix metalloproteinases: implications for tumor growth and metastasis. **Can J Physiol Pharmacol**, v.77, n.7, Jul, p.465-80. 1999.

FRANCHINI, D. M., SCHMITZ, K. M., *et al.* 5-Methylcytosine DNA demethylation: more than losing a methyl group. **Annu Rev Genet**, v.46, p.419-41. 2012.

FREITAS-JUNIOR, R., GONZAGA, C. M., *et al.* Disparities in female breast cancer mortality rates in Brazil between 1980 and 2009. **Clinics**, v.67, n.7, Jul, p.731-7. 2012.

FRIBERG, S., TAUBE, A., *et al.* Analysis and presentation. Clinical trials on prostate cancer. **Urology**, v.49, n.4A Suppl, Apr, p.54-65. 1997.

FRIDMAN, R., FUERST, T. R., *et al.* Domain structure of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. Characterization of proteolytic activity and identification of the tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) binding regions. **J Biol Chem**, v.267, n.22, Aug 5, p.15398-405. 1992.

GARBETT, E. A., REED, M. W., *et al.* Proteolysis in human breast cancer. **Mol Pathol**, v.53, n.2, Apr, p.99-106. 2000.

GARDINER-GARDEN, M., FROMMER, M. CpG islands in vertebrate genomes. **J Mol Biol**, Jul 20;196(2):261-82. 1987.

GARZON, R., MARCUCCI, G., *et al.* Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. **Nat Rev Drug Discov**, v.9, n.10, Oct, p.775-89. 2010.

GAUDET, M. M., CAMPAN, M., *et al.* DNA hypermethylation of ESR1 and PGR in breast cancer: pathologic and epidemiologic associations. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v.18, n.11, Nov, p.3036-43. 2009.

GIACINTI, L., P. P., *et al.* Epigenetic information and estrogen receptor alpha expression in breast cancer. **Oncologist**, v.11, n.1, Jan, p.1-8. 2006.

GIRARDOT, M., CAVAILLE, J., *et al.* Small regulatory RNAs controlled by genomic imprinting and their contribution to human disease. **Epigenetics**, v.7, n.12, Nov 15. 2012.

GOLL, M. G., BESTOR, T. H. Eukaryotic cytosine methyltransferases. **Annu Rev Biochem**, v.74, p.481-514. 2005.

GOMEZ, D. E., ALONSO, D.F., *et al.* Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. **Eur J Cell Biol**, v.74, n.2, Oct, p.111-22. 1997.

GRAHAM, J. D., YAGER, M. L., *et al.* Altered progesterone receptor isoform expression remodels progesterone responsiveness of breast cancer cells. **Mol Endocrinol**, v.19, n.11, Nov, p.2713-35. 2005.

GREGER, J. G., FURSOV, N., *et al.* Phosphorylation of MNAR promotes estrogen activation of phosphatidylinositol 3-kinase. **Mol Cell Biol**, v.27, n.5, Mar, p.1904-13. 2007.

GRONBAEK, K., HOTHER, C., *et al.* Epigenetic changes in cancer. **APMIS**, v.115, n.10, Oct, p.1039-59. 2007.

- GU, T. P., GUO, F., *et al.* The role of Tet3 DNA dioxygenase in epigenetic reprogramming by oocytes. **Nature**, v.477, n.7366, Sep 29, p.606-10. 2011.
- HABERLAND, M., MONTGOMERY, R. L., *et al.* The many roles of histone deacetylases in development and physiology: implications for disease and therapy. **Nat Rev Genet**, v.10, n.1, Jan, p.32-42. 2009.
- HAHN, M. A., QIU, R., *et al.* Dynamics of 5-hydroxymethylcytosine and chromatin marks in Mammalian neurogenesis. **Cell Rep**, v.3, n.2, Feb 21, p.291-300. 2013.
- HAJKOVA, P., JEFFRIES, S. J., *et al.* Genome-wide reprogramming in the mouse germ line entails the base excision repair pathway. **Science**, v.329, n.5987, Jul 2, p.78-82. 2010.
- HANAHAN, D., WEINBERG, R.A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v.100, n.1, Jan 7, p.57-70. 2000.
- _____. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v.144, n.5, Mar 4, p.646-74. 2011.
- HARENDZA, S., LOVETT, D. H., *et al.* Linked common polymorphisms in the gelatinase a promoter are associated with diminished transcriptional response to estrogen and genetic fitness. **J Biol Chem**, v.278, n.23, Jun 6, p.20490-9. 2003.
- HARRIS, C. C. Structure and function of the p53 tumor suppressor gene: clues for rational cancer therapeutic strategies. **J Natl Cancer Inst**, v.88, n.20, Oct 16, p.1442-55. 1996.
- HE, Y. F., LI, B.Z., *et al.* Tet-mediated formation of 5-carboxylcytosine and its excision by TDG in mammalian DNA. **Science**, v.333, n.6047, Sep 2, p.1303-7. 2011.
- HEBBES, T. R., THORNE, A.W., *et al.* A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. **EMBO J**, v.7, n.5, May, p.1395-402. 1988.
- HELLEMAN, J., JANSEN, M. P., *et al.* Association of an extracellular matrix gene cluster with breast cancer prognosis and endocrine therapy response. **Clin Cancer Res**, v.14, n.17, Sep 1, p.5555-64. 2008.
- HENIKOFF, S., MCKITTRICK, E., *et al.* Epigenetics, histone H3 variants, and the inheritance of chromatin states. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v.69, p.235-43. 2004.
- HERMAN, M. P., SUKHOVA, G. K., *et al.* Tissue factor pathway inhibitor-2 is a novel inhibitor of matrix metalloproteinases with implications for atherosclerosis. **J Clin Invest**, v.107, n.9, May, p.1117-26. 2001.
- HERVOUET, E., CARTRON, P.F., *et al.* Epigenetic regulation of estrogen signaling in breast cancer. **Epigenetics**, v.8, n.3, Mar, p.237-45. 2013.
- HINSHELWOOD, R. A., MELKI, J. R., *et al.* Aberrant de novo methylation of the p16INK4A CpG island is initiated post gene silencing in association with chromatin remodelling and mimics nucleosome positioning. **Hum Mol Genet**, v.18, n.16, Aug 15, p.3098-109. 2009.
- HIROHASHI, S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. **Am J Pathol**. Aug;153(2):333-9. 1998.
- HOFMANN, U. B., WESTPHAL, J. R., *et al.* Expression and activation of matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) and its co-localization with membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) correlate with melanoma progression. **J Pathol**, v.191, n.3, Jul, p.245-56. 2000.
- HOTARY, K. B., ALLEN, E. D., *et al.* Membrane type I matrix metalloproteinase usurps tumor growth control imposed by the three-dimensional extracellular matrix. **Cell**, v.114, n.1, Jul 11, p.33-45. 2003.
- HOWLETT, S. K., REIK, W. Methylation levels of maternal and paternal genomes during preimplantation development. **Development**, v.113, n.1, Sep, p.119-27. 1991.

HSU, N.C., HUANG, Y.F., YOKOYAMA, K.K., *et al.* Methylation of BRCA1 promoter region is associated with unfavorable prognosis in women with early-stage breast cancer. **PLoS One**. 2013;8(2):e56256.

HU, C. P., DANDAPAT, A., *et al.* Blockade of hypoxia-reoxygenation-mediated collagen type I expression and MMP activity by overexpression of TGF-beta1 delivered by AAV in mouse cardiomyocytes. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v.293, n.3, Sep, p.H1833-8. 2007.

HUANG, S., ZHU,Z., *et al.* Tet1 is required for Rb phosphorylation during G1/S phase transition. **Biochem Biophys Res Commun**, v.434, n.2, May 3, p.241-4. 2013.

HUBBERT, C., GUARDIOLA, A., *et al.* HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. **Nature**, v.417, n.6887, May 23, p.455-8. 2002.

HUHTALA, P., CHOW, L.T., TRYGGVASON, K. Structure of the human type IV collagenase gene. **J Biol Chem**. Jul 5;265(19):11077-82. 1990.

HURTUBISE, A., MOMPARTLER, R. L. Effect of histone deacetylase inhibitor LAQ824 on antineoplastic action of 5-Aza-2'-deoxycytidine (decitabine) on human breast carcinoma cells. **Cancer Chemother Pharmacol**, v.58, n.5, Nov, p.618-25. 2006.

HYNES, R. O. Fibronectins. **Springer-Verlag**, 1990.

IKEDA, K., INOUE, S. Estrogen receptors and their downstream targets in cancer. **Arch Histol Cytol**, v.67, n.5, Dec, p.435-42. 2004.

INCA. Incidência do câncer no Brasil. **Estimativa 2012**: 100 p. 2012.

IOACHIM, E., CHARCHANTI, A., *et al.* Immunohistochemical expression of extracellular matrix components tenascin, fibronectin, collagen type IV and laminin in breast cancer: their prognostic value and role in tumour invasion and progression. **Eur J Cancer**, v.38, n.18, Dec, p.2362-70. 2002.

ITO, S., D'ALESSIO, A. C., *et al.* Role of Tet proteins in 5mC to 5hmC conversion, ES-cell self-renewal and inner cell mass specification. **Nature**, v.466, n.7310, Aug 26, p.1129-33. 2010.

JACKSON-GRUSBY, L., BEARD,C., *et al.* Loss of genomic methylation causes p53-dependent apoptosis and epigenetic deregulation. **Nat Genet**, v.27, n.1, Jan, p.31-9. 2001.

JENUWEIN, T., ALLIS, C. D. Translating the histone code. **Science**, v.293, n.5532, Aug 10, p.1074-80. 2001.

JEZIERSKA, A., MOTYL, T. Matrix metalloproteinase-2 involvement in breast cancer progression: a mini-review. **Med Sci Monit**, v.15, n.2, Feb, p.RA32-40. 2009.

JIANG, W. G., DAVIES, G., *et al.* Expression of membrane type-1 matrix metalloproteinase, MT1-MMP in human breast cancer and its impact on invasiveness of breast cancer cells. **Int J Mol Med**, v.17, n.4, Apr, p.583-90. 2006.

JIANG, Y., LANGLEY,B., *et al.* Epigenetics in the nervous system. **J Neurosci**, v.28, n.46, Nov 12, p.11753-9. 2008.

JIAO, Y., FENG, X., *et al.* Matrix metalloproteinase-2 promotes alphavbeta3 integrin-mediated adhesion and migration of human melanoma cells by cleaving fibronectin. **PLoS One**, v.7, n.7, p.e41591. 2012.

JOHNSON, M. D., TORRI, J. A., *et al.* Regulation of motility and protease expression in PKC-mediated induction of MCF-7 breast cancer cell invasiveness. **Exp Cell Res**, v.247, n.1, Feb 25, p.105-13. 1999.

JONES, P. A. Functions of DNA methylation: islands, start sites, gene bodies and beyond. **Nat Rev Genet**, v.13, n.7, Jul, p.484-92. 2012.

- JONES, P.A., BAYLIN, S.B. The epigenomics of cancer. *Cell*. 2007 Feb 23;128(4):683-92. Jones, P. A. e S. B. Baylin. The fundamental role of epigenetic events in cancer. **Nat Rev Genet**, v.3, n.6, Jun, p.415-28. 2002.
- JONES, P. L., VEENSTRA, G. J., *et al*. Methylated DNA and MeCP2 recruit histone deacetylase to repress transcription. **Nat Genet**, v.19, n.2, Jun, p.187-91. 1998.
- JOVANOVIĆ, J., RØNNEBERG, J.A., TOST, J., KRISTENSEN, V. The epigenetics of breast cancer. **Mol Oncol**. Jun;4(3):242-54. 2010.
- JULIANO, R. L. Signal transduction by cell adhesion receptors and the cytoskeleton: functions of integrins, cadherins, selectins, and immunoglobulin-superfamily members. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v.42, p.283-323. 2002.
- KALA, R., PEEK, G. W., *et al*. MicroRNAs: an emerging science in cancer epigenetics. **J Clin Bioinforma**, v.3, n.1, p.6. 2013.
- KALLURI, R., WEINBERG, R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **J Clin Invest**, v.119, n.6, Jun, p.1420-8. 2009.
- KEEN, J. C., GARRETT-MAYER, E., *et al*. Epigenetic regulation of protein phosphatase 2A (PP2A), lymphotactin (XCL1) and estrogen receptor alpha (ER) expression in human breast cancer cells. **Cancer Biol Ther**, v.3, n.12, Dec, p.1304-12. 2004.
- KENNY, H. A., KAUR, S., *et al*. The initial steps of ovarian cancer cell metastasis are mediated by MMP-2 cleavage of vitronectin and fibronectin. **J Clin Invest**, v.118, n.4, Apr, p.1367-79. 2008.
- KHWAJA, A., RODRIGUEZ-VICIANA, P., *et al*. Matrix adhesion and Ras transformation both activate a phosphoinositide 3-OH kinase and protein kinase B/Akt cellular survival pathway. **EMBO J**, v.16, n.10, May 15, p.2783-93. 1997.
- KLEIN, A., OLENDROWITZ, C., *et al*. Identification of brain- and bone-specific breast cancer metastasis genes. **Cancer Lett**, v.276, n.2, Apr 18, p.212-20. 2009.
- KLEIN, K. A., REITER, R. E., *et al*. Progression of metastatic human prostate cancer to androgen independence in immunodeficient SCID mice. **Nat Med**, v.3, n.4, Apr, p.402-8. 1997.
- KLEINER, D. E., STETLER-STEVENSON, W. G. Quantitative zymography: detection of picogram quantities of gelatinases. **Anal Biochem**, v.218, n.2, May 1, p.325-9. 1994.
- KOHONEN-CORISH, M. R., SIGGLEKOW, N. D., *et al*. Promoter methylation of the mutated in colorectal cancer gene is a frequent early event in colorectal cancer. **Oncogene**, v.26, n.30, Jun 28, p.4435-41. 2007.
- KOHRMANN, A., KAMMERER, U., *et al*. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs) in primary human breast cancer and breast cancer cell lines: New findings and review of the literature. **BMC Cancer**, v.9, p.188. 2009.
- KORNBERG, L., EARP, H. S., *et al*. Cell adhesion or integrin clustering increases phosphorylation of a focal adhesion-associated tyrosine kinase. **J Biol Chem**, v.267, n.33, Nov 25, p.23439-42. 1992.
- KOUROS-MEHR, H., BECHIS, S.K., *et al*. GATA-3 links tumor differentiation and dissemination in a luminal breast cancer model. **Cancer Cell**, v.13, n.2, Feb, p.141-52. 2008.
- KOUZARIDES, T. Chromatin modifications and their function. **Cell**, v.128, n.4, Feb 23, p.693-705. 2007.
- KRIAUCIONIS, S., HEINTZ, N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. **Science**, v.324, n.5929, May 15, p.929-30. 2009.
- KROLIK, M., MILNEROWICZ, H. The effect of using estrogens in the light of scientific research. **Adv Clin Exp Med**, v.21, n.4, Jul-Aug, p.535-43. 2012.

- KUBAREK, L., JAGODZINSKI, P. P. Epigenetic up-regulation of CXCR4 and CXCL12 expression by 17 beta-estradiol and tamoxifen is associated with formation of DNA methyltransferase 3B4 splice variant in Ishikawa endometrial adenocarcinoma cells. **FEBS Lett**, v.581, n.7, Apr 3, p.1441-8. 2007.
- KURBEL, S. Model of tumor-associated epigenetic changes of HER2, ER, and PgR expression in invasive breast cancer phenotypes. **Tumour Biol**, May 3. 2013.
- LA ROCCA, G., I. PUCCI-MINAFRA, *et al.* Zymographic detection and clinical correlations of MMP-2 and MMP-9 in breast cancer sera. **Br J Cancer**, v.90, n.7, Apr 5, p.1414-21. 2004.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.5259, Aug 15, p.680-5. 1970.
- LAKSHMIKUTTYAMMA, A., SCOTT, S. A., *et al.* Reexpression of epigenetically silenced AML tumor suppressor genes by SUV39H1 inhibition. **Oncogene**, v.29, n.4, Jan 28, p.576-88. 2009.
- LEBER, T. M., BALKWILL, F. R. Zymography: a single-step staining method for quantitation of proteolytic activity on substrate gels. **Anal Biochem**, v.249, n.1, Jun 15, p.24-8. 1997.
- LEE, M., R. FRIDMAN, *et al.* Extracellular proteases as targets for treatment of cancer metastases. **Chem Soc Rev**, v.33, n.7, Sep 10, p.401-9. 2004.
- LELIEVRE, S. A. Contributions of extracellular matrix signaling and tissue architecture to nuclear mechanisms and spatial organization of gene expression control. **Biochim Biophys Acta**, v.1790, n.9, Sep, p.925-35. 2009.
- LEMOINE, M., YOUNES, A. Histone deacetylase inhibitors in the treatment of lymphoma. **Discov Med**, v.10, n.54, Nov, p.462-70. 2010.
- LEU, Y. W., YAN, P. S., *et al.* Loss of estrogen receptor signaling triggers epigenetic silencing of downstream targets in breast cancer. **Cancer Res**, v.64, n.22, Nov 15, p.8184-92. 2004.
- LEWIS, B. A., REINBERG, D. The mediator coactivator complex: functional and physical roles in transcriptional regulation. **J Cell Sci**, v.116, n.Pt 18, Sep 15, p.3667-75. 2003.
- LI, E., BESTOR, T. H., *et al.* Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. **Cell**, v.69, n.6, Jun 12, p.915-26. 1992.
- LIN, R. Z., CHANG, H. Y.. Recent advances in three-dimensional multicellular spheroid culture for biomedical research. **Biotechnol J**, v.3, n.9-10, Oct, p.1172-84. 2008.
- LIU, D., GUO, H., *et al.* Association between polymorphisms in the promoter regions of matrix metalloproteinases (MMPs) and risk of cancer metastasis: a meta-analysis. **PLoS One**, v.7, n.2, p.e31251. 2012.
- LIU, Z. J., ZHANG, X. B., *et al.* Progesterone receptor gene inactivation and CpG island hypermethylation in human leukemia cancer cells. **FEBS Lett**, v.567, n.2-3, Jun 4, p.327-32. 2004.
- LIVAK, K.J., SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**. Dec;25(4):402-8. 2001.
- LÓPEZ-OTÍN, C., OVERALL, C.M. Protease degradomics: a new challenge for proteomics. **Nat Rev Mol Cell Biol**. Jul;3(7):509-19. 2002.
- MARJORIBANKS, J., FARQUHAR, C., *et al.* Long term hormone therapy for perimenopausal and postmenopausal women. **Cochrane Database Syst Rev**, v.7, p.CD004143. 2012.
- MATTICK, J. S., MAKUNIN, I. V. Non-coding RNA. **Hum Mol Genet**, v.15 Spec No 1, Apr 15, p.R17-29. 2006.

- MAY, A., KIRCHNER, R., *et al.* Multiplex rt-PCR expression analysis of developmentally important genes in individual mouse preimplantation embryos and blastomeres. **Biol Reprod**, v.80, n.1, Jan, p.194-202. 2009.
- MAYER, W., SMITH, A., *et al.* Spatial separation of parental genomes in preimplantation mouse embryos. **J Cell Biol**, v.148, n.4, Feb 21, p.629-34. 2000.
- MCGARVEY, K. M., FAHRNER, J. A., *et al.* Silenced tumor suppressor genes reactivated by DNA demethylation do not return to a fully euchromatic chromatin state. **Cancer Res**, v.66, n.7, Apr 1, p.3541-9. 2006.
- MCGHEE, J. D., FELSENFELD, G. The number of charge-charge interactions stabilizing the ends of nucleosome DNA. **Nucleic Acids Res**, v.8, n.12, Jun 25, p.2751-69. 1980.
- MCKITTRICK, E., GAFKEN, P. R., *et al.* Histone H3.3 is enriched in covalent modifications associated with active chromatin. **Proc Natl Acad Sci**, v.101, n.6, Feb 10, p.1525-30. 2004.
- MENG, X. N., JIN, Y., *et al.* Characterisation of fibronectin-mediated FAK signalling pathways in lung cancer cell migration and invasion. **Br J Cancer**, v.101, n.2, Jul 21, p.327-34. 2009.
- MERTINEIT, C., YODER, J. A., *et al.* Sex-specific exons control DNA methyltransferase in mammalian germ cells. **Development**, v.125, n.5, Mar, p.889-97. 1998.
- MIETTINEN, P. J., EBNER, R., *et al.* TGF-beta induced transdifferentiation of mammary epithelial cells to mesenchymal cells: involvement of type I receptors. **J Cell Biol**, v.127, n.6 Pt 2, Dec, p.2021-36. 1994.
- MILUTINOVIC, S., D'ALESSIO, A.C., *et al.* Valproate induces widespread epigenetic reprogramming which involves demethylation of specific genes. **Carcinogenesis**, v.28, n.3, Mar, p.560-71. 2007.
- MINUCCI, S., PELICCI, P.G. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. **Nat Rev Cancer**, v.6, n.1, Jan, p.38-51. 2006.
- MIRANDA, K. C., HUYNH, T., *et al.* A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. **Cell**, v.126, n.6, Sep 22, p.1203-17. 2006.
- MIRZA, S., SHARMA, G., *et al.* Clinical significance of Stratifin, ERalpha and PR promoter methylation in tumor and serum DNA in Indian breast cancer patients. **Clin Biochem**, v.43, n.4-5, Mar, p.380-6. 2009.
- MITRA, A., CHAKRABARTI, J., *et al.* Culture of human cervical cancer cells, SiHa, in the presence of fibronectin activates MMP-2. **J Cancer Res Clin Oncol**, v.132, n.8, Aug, p.505-13. 2006.
- MIYAMOTO, S., TERAMOTO, H., *et al.* Integrin function: molecular hierarchies of cytoskeletal and signaling molecules. **J Cell Biol**, v.131, n.3, Nov, p.791-805. 1995.
- MOMPARLER, R. L., SAMSON, J., *et al.* Cell cycle effects and cellular pharmacology of 5-aza-2'-deoxycytidine. **Cancer Chemother Pharmacol**, v.13, n.3, p.191-4. 1984.
- MORI, T., KIM, J., *et al.* Epigenetic up-regulation of C-C chemokine receptor 7 and C-X-C chemokine receptor 4 expression in melanoma cells. **Cancer Res**, v.65, n.5, Mar 1, p.1800-7. 2005.
- MOROZ, A., DELELLA, F.K., *et al.* Fibronectin induces MMP2 expression in human prostate cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v.430, n.4, Jan 25, p.1319-21. 2013.
- MOTT, J. D., THOMAS, C.L., *et al.* Post-translational proteolytic processing of procollagen C-terminal proteinase enhancer releases a metalloproteinase inhibitor. **J Biol Chem**, v.275, n.2, Jan 14, p.1384-90. 2000.

- MULLER, K., VAN ZANDBERGEN, G., *et al.* Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of *Leishmania major* infection in mice. **Med Microbiol Immunol**, v.190, n.1-2, Nov, p.73-6. 2001.
- MUNSHI, H.G., STACK, M.S. Reciprocal interactions between adhesion receptor signaling and MMP regulation. **Cancer Metastasis Rev.** Mar;25(1):45-56. 2006.
- MURAYAMA, A., SAKURA, K., *et al.* A specific CpG site demethylation in the human interleukin 2 gene promoter is an epigenetic memory. **EMBO J**, v.25, n.5, Mar 8, p.1081-92. 2006.
- MURRELL, A., RAKYAN, V.K., *et al.* From genome to epigenome. **Hum Mol Genet**, v.14 Spec No 1, Apr 15, p.R3-R10. 2005.
- NAKAMURA, T., LIU, Y.J., NAKASHIMA, *et al.* PGC7 binds histone H3K9me2 to protect against conversion of 5mC to 5hmC in early embryos. **Nature**. Jun 3;486(7403):415-9. 2012.
- NAGASE, H., VISSE, R., *et al.* Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovasc Res**, v.69, n.3, Feb 15, p.562-73. 2006.
- NASS, S.J., HERMAN, J.G., GABRIELSON, E., *et al.* Aberrant methylation of the estrogen receptor and E-cadherin 5' CpG islands increases with malignant progression in human breast cancer. **Cancer Res**. Aug 15;60(16):4346-8. 2000.
- NETZER, K. O., SUZUKI, K., *et al.* Comparative analysis of the noncollagenous NC1 domain of type IV collagen: identification of structural features important for assembly, function, and pathogenesis. **Protein Sci**, v.7, n.6, Jun, p.1340-51. 1998.
- NGUYEN, M. M., GILL, I. S. Effect of renal cancer size on the prevalence of metastasis at diagnosis and mortality. **J Urol**, v.181, n.3, Mar, p.1020-7; discussion 1027. 2009.
- OH, J., TAKAHASHI, R., *et al.* The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. **Cell**, v.107, n.6, Dec 14, p.789-800. 2001.
- OOI, S. K., QIU, C., *et al.* DNMT3L connects unmethylated lysine 4 of histone H3 to de novo methylation of DNA. **Nature**, v.448, n.7154, Aug 9, p.714-7. 2007.
- ORDOG, T., SYED, S. A., *et al.* Epigenetics and chromatin dynamics: a review and a paradigm for functional disorders. **Neurogastroenterol Motil**, v.24, n.12, Dec, p.1054-68. 2012.
- OVERALL, C. M., LOPEZ-OTIN, C. Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. **Nat Rev Cancer**, v.2, n.9, Sep, p.657-72. 2002.
- PAGE-MCCAW, A., EWALD, A. J., *et al.* Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.8, n.3, Mar, p.221-33. 2007.
- PAGET, S. The distribution of secondary growths in cancer of the breast. 1889. **Cancer Metastasis Rev**, v.8, n.2, Aug, p.98-101. 1989.
- PAN, M. R., HUNG, W. C. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs inhibit matrix metalloproteinase-2 via suppression of the ERK/Sp1-mediated transcription. **J Biol Chem**, v.277, n.36, Sep 6, p.32775-80. 2002.
- PARK, J., SCHWARZBAUER, J. E. Mammary epithelial cell interactions with fibronectin stimulate epithelial-mesenchymal transition. **Oncogene**, Apr 29. 2013.
- PETERSON, C.L., LANIEL, M.A. Histones and histone modifications. **Curr Biol**. Jul 27;14(14):R546-51. 2004
- POLYAK, K. Breast cancer: origins and evolution. **J Clin Invest**, v.117, n.11, Nov, p.3155-63. 2007.

- POLYAK, K., WEINBERG, R. A. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. **Nat Rev Cancer**, v.9, n.4, Apr, p.265-73. 2009.
- POPP, C., DEAN, W., *et al.* Genome-wide erasure of DNA methylation in mouse primordial germ cells is affected by AID deficiency. **Nature**, v.463, n.7284, Feb 25, p.1101-5. 2010.
- PRYZBYLKOWSKI, P., O. OBAJIMI, *et al.* Trichostatin A and 5 Aza-2' deoxycytidine decrease estrogen receptor mRNA stability in ER positive MCF7 cells through modulation of HuR. **Breast Cancer Res Treat**, v.111, n.1, Sep, p.15-25. 2007.
- QIAN, B. Z., J. LI, *et al.* CCL2 recruits inflammatory monocytes to facilitate breast-tumour metastasis. **Nature**, v.475, n.7355, Jul 14, p.222-5. 2011.
- RADISKY, E. S., RADISKY, D.C. Matrix metalloproteinase-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v.15, n.2, Jun, p.201-12. 2010.
- RAKHA, E. A., EL-SAYED, M.E. *et al.* Biologic and clinical characteristics of breast cancer with single hormone receptor positive phenotype. **J Clin Oncol**, v.25, n.30, Oct 20, p.4772-8. 2007.
- RAMOS, E. A., CAMARGO, A. A., *et al.* Simultaneous CXCL12 and ESR1 CpG island hypermethylation correlates with poor prognosis in sporadic breast cancer. **BMC Cancer**, v.10, p.23. 2010.
- RAZIN, A., RIGGS, A. D. DNA methylation and gene function. **Science**, v.210, n.4470, Nov 7, p.604-10. 1980.
- RAVANTI, L., HEINO, J., LÓPEZ-OTÍN, C., KÄHÄRI, V.M. Induction of collagenase-3 (MMP-13) expression in human skin fibroblasts by three-dimensional collagen is mediated by p38 mitogen-activated protein kinase. **J Biol Chem**. Jan 22;274(4):2446-55. 1999.
- REIK, W. Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development. **Nature**, v.447, n.7143, May 24, p.425-32. 2007.
- RICHON, V. M., EMILIANI, S., *et al.* A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. **Proc Natl Acad Sci**, v.95, n.6, Mar 17, p.3003-7. 1998.
- RIVERA, R. M., ROSS, J. W. Epigenetics in fertilization and preimplantation embryo development. **Prog Biophys Mol Biol**, Feb 27. 2013.
- ROBERTS, L. M., VISSER, J. A., *et al.* Involvement of a matrix metalloproteinase in MIS-induced cell death during urogenital development. **Development**, v.129, n.6, Mar, p.1487-96. 2002.
- SABEH, F., OTA, I., *et al.* Tumor cell traffic through the extracellular matrix is controlled by the membrane-anchored collagenase MT1-MMP. **J Cell Biol**, v.167, n.4, Nov 22, p.769-81. 2004.
- SAMBROOK, J., RUSSEL, D.W. Molecular cloning: A laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory**, 2001.
- SANDOVAL, J., ESTELLER, M. Cancer epigenomics: beyond genomics. **Curr Opin Genet Dev**, v.22, n.1, Feb, p.50-5. 2012.
- SATO, N., MATSUBAYASHI, H., *et al.* The chemokine receptor CXCR4 is regulated by DNA methylation in pancreatic cancer. **Cancer Biol Ther**, v.4, n.1, Jan, p.70-6. 2005.
- SETHI, N., KANG, Y. Notch signalling in cancer progression and bone metastasis. **Br J Cancer**, v.105, n.12, Dec 6, p.1805-10. 2011.
- SIEGEL, R., NAISHADHAM, D., *et al.* Cancer statistics, 2013. **CA Cancer J Clin**, v.63, n.1, Jan, p.11-30. 2013.

SINGER, C.F., KRONSTEINER, N., MARTON, E., *et al.* MMP-2 and MMP-9 expression in breast cancer-derived human fibroblasts is differentially regulated by stromal-epithelial interactions. **Breast Cancer Res Treat.** Mar;72(1):69-77. 2002

SMALLEY, K. S., LIONI, M., *et al.* Life isn't flat: taking cancer biology to the next dimension. **In Vitro Cell Dev Biol Anim**, v.42, n.8-9, Sep-Oct, p.242-7. 2006.

SNOEK-VAN BEURDEN, P. A., VON DEN HOFF, J.W. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. **Biotechniques**, v.38, n.1, Jan, p.73-83. 2005.

SOTIRIOU, C., PUSZTAI, L. Gene-expression signatures in breast cancer. **N Engl J Med**, v.360, n.8, Feb 19, p.790-800. 2009.

SPORN, M. B. The war on cancer. **Lancet**, v.347, n.9012, May 18, p.1377-81. 1996.

STAMENKOVIC, I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. **Semin Cancer Biol**, v.10, n.6, Dec, p.415-33. 2000.

STAMPS, A. C., DAVIES, S.C., *et al.* Analysis of proviral integration in human mammary epithelial cell lines immortalized by retroviral infection with a temperature-sensitive SV40 T-antigen construct. **Int J Cancer**, v.57, n.6, Jun 15, p.865-74. 1994.

STEFFENSEN, B., WALLON, U.M., *et al.* Extracellular matrix binding properties of recombinant fibronectin type II-like modules of human 72-kDa gelatinase/type IV collagenase. High affinity binding to native type I collagen but not native type IV collagen. **J Biol Chem**, v.270, n.19, May 12, p.11555-66. 1995.

STEFFENSEN, B., X. XU, *et al.* Human fibronectin and MMP-2 collagen binding domains compete for collagen binding sites and modify cellular activation of MMP-2. **Matrix Biol**, v.21, n.5, Aug, p.399-414. 2002.

STERNLICHT, M. D., WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v.17, p.463-516. 2001.

STETLER-STEVENSON, W. G. Type IV collagenases in tumor invasion and metastasis. **Cancer Metastasis Rev**, v.9, n.4, Dec, p.289-303. 1990.

TAHILIANI, M., KOH, K.P., *et al.* Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. **Science**, v.324, n.5929, May 15, p.930-5. 2009.

TAKAHASHI, C., SHENG, Z., *et al.* Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. **Proc Natl Acad Sci**, v.95, n.22, Oct 27, p.13221-6. 1998.

TAKESHITA, K., SUETAKE, I., *et al.* Structural insight into maintenance methylation by mouse DNA methyltransferase 1 (Dnmt1). **Proc Natl Acad Sci**, v.108, n.22, May 31, p.9055-9. 2011.

TAPIA, T., SMALLEY, S.V., KOHEN, P., *et al.* Promoter hypermethylation of BRCA1 correlates with absence of expression in hereditary breast cancer tumors. **Epigenetics**, 2008 May-Jun;3(3):157-63.

TATE, P.H., BIRD, A.P. Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. **Curr Opin Genet Dev**. 1993 Apr;3(2):226-31.

TEITELL, M., RICHARDSON, B. DNA methylation in the immune system. **Clin Immunol**, v.109, n.1, Oct, p.2-5. 2003.

TEPERINO, R., LEMPRADL, A., *et al.* Bridging epigenomics and complex disease: the basics. **Cell Mol Life Sci**, v.70, n.9, May, p.1609-21. 2013.

- TOMIZAWA, S., KOBAYASHI, H., *et al.* Dynamic stage-specific changes in imprinted differentially methylated regions during early mammalian development and prevalence of non-CpG methylation in oocytes. **Development**, v.138, n.5, Mar, p.811-20. 2011.
- TORRICELLI, C., FORTINO, V., *et al.* Role of PTHrp and PTHrp-engaged pathways in MCF-7 cells migration/invasion. **Matrix Biol**, v.25, n.2, Mar, p.104-11. 2006.
- TSUMAGARI, K., BARIBAULT, C., *et al.* Early de novo DNA methylation and prolonged demethylation in the muscle lineage. **Epigenetics**, v.8, n.3, Mar, p.317-32. 2013.
- TSUMURA, A., HAYAKAWA, T., *et al.* Maintenance of self-renewal ability of mouse embryonic stem cells in the absence of DNA methyltransferases Dnmt1, Dnmt3a and Dnmt3b. **Genes Cells**, v.11, n.7, Jul, p.805-14. 2006.
- TURNER, B. M. Histone acetylation and an epigenetic code. **Bioessays**, v.22, n.9, Sep, p.836-45. 2000.
- _____. Reading signals on the nucleosome with a new nomenclature for modified histones. **Nat Struct Mol Biol**, v.12, n.2, Feb, p.110-2. 2005.
- UMLAUF, D., GOTO, Y., *et al.* Site-specific analysis of histone methylation and acetylation. **Methods Mol Biol**, v.287, p.99-120. 2004.
- VALINLUCK, V., SOWERS, L.C. Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. **Cancer Res**, v.67, n.3, Feb 1, p.946-50. 2007.
- VAN DER FLIER, A., SONNENBERG, A. Function and interactions of integrins. **Cell Tissue Res**, v.305, n.3, Sep, p.285-98. 2001.
- WANG, J., CAI, Y. Matrix metalloproteinase 2 polymorphisms and expression in lung cancer: a meta-analysis. **Tumour Biol**, v.33, n.6, Dec, p.1819-28. 2012.
- WEI, J., HAN, B., *et al.* Promoter methylation status and expression of estrogen receptor alpha in familial breast cancer patients. **Tumour Biol**, v.33, n.2, Apr, p.413-20. 2012.
- WEINBERG, R. A. Oncogenes, antioncogenes, and the molecular bases of multistep carcinogenesis. **Cancer Res**, v.49, n.14, Jul 15, p.3713-21. 1989.
- WELM, B., MOTT, J., *et al.* Developmental biology: vasculogenesis is a wreck without RECK. **Curr Biol**, v.12, n.6, Mar 19, p.R209-11. 2002.
- WENDT, M. K., JOHANESSEN, P.A., *et al.* Silencing of epithelial CXCL12 expression by DNA hypermethylation promotes colonic carcinoma metastasis. **Oncogene**, v.25, n.36, Aug 17, p.4986-97. 2006.
- WIDSCHWENDTER, M. 5-methylcytosine--the fifth base of DNA: the fifth wheel on a car or a highly promising diagnostic and therapeutic target in cancer? **Dis Markers**, v.23, n.1-2, p.1-3. 2007.
- WIERZBICKA-PATYNOWSKI, I., SCHWARZBAUER, J.E. The ins and outs of fibronectin matrix assembly. **J Cell Sci**. Aug 15;116(Pt 16):3269-76. 2003.
- WILLIAMS, K., CHRISTENSEN, J., *et al.* DNA methylation: TET proteins-guardians of CpG islands? **EMBO Rep**, v.13, n.1, Jan, p.28-35. 2012.
- WILSON, S. R., GALLAGHER, S., *et al.* Amplification of MMP-2 and MMP-9 production by prostate cancer cell lines via activation of protease-activated receptors. **Prostate**, v.60, n.2, Jul 1, p.168-74. 2004.
- WOSSIDLO, M., ARAND, J., *et al.* Dynamic link of DNA demethylation, DNA strand breaks and repair in mouse zygotes. **EMBO J**, v.29, n.11, Jun 2, p.1877-88. 2010.

- WOSSIDLO, M., NAKAMURA, T., *et al.* 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. **Nat Commun**, v.2, p.241. 2011.
- WU, H., ZHANG, Y. Mechanisms and functions of Tet protein-mediated 5-methylcytosine oxidation. **Genes Dev**, v.25, n.23, Dec 1, p.2436-52. 2011.
- YANG, X. J., SETO, E. HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. **Oncogene**, v.26, n.37, Aug 13, p.5310-8. 2007.
- YOSHIDA, M., KIJIMA, M., *et al.* Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. **J Biol Chem**, v.265, n.28, Oct 5, p.17174-9. 1990.
- YOSHIURA, K., KANAI, Y., OCHIAI, A., *et al.* Silencing of the E-cadherin invasion-suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. **Proc Natl Acad Sci**, Aug 1;92(16):7416-9. 1995.
- YU, C., ZHOU, Y., *et al.* Functional haplotypes in the promoter of matrix metalloproteinase-2 predict risk of the occurrence and metastasis of esophageal cancer. **Cancer Res**, v.64, n.20, Oct 15, p.7622-8. 2004.
- ZHANG, C., LI, C., *et al.* Meta-analysis of MMP2, MMP3, and MMP9 promoter polymorphisms and head and neck cancer risk. **PLoS One**, v.8, n.4, p.e62023. 2013.
- ZHANG, Y., REINBERG, D. Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. **Genes Dev**, v.15, n.18, Sep 15, p.2343-60. 2001.
- ZHUANG, J., JONES, A., LEE, S-H, *et al.* The Dynamics and Prognostic Potential of DNA Methylation Changes at Stem Cell Gene Loci in Women's Cancer. **PLoS Genet**, 8 (2). 2012.
- ZOU, X., MA, W., SOLOV'YOV, I.A., CHIPOT, C., SCHULTEN K. Recognition of methylated DNA through methyl-CpG binding domain proteins. **Nucleic Acids Res**, 40:2747–58. 2011.
- ZLOTNIK, A., BURKHARDT, A. M., *et al.* Homeostatic chemokine receptors and organ-specific metastasis. **Nat Rev Immunol**, v.11, n.9, Sep, p.597-606. 2011.

Anexo



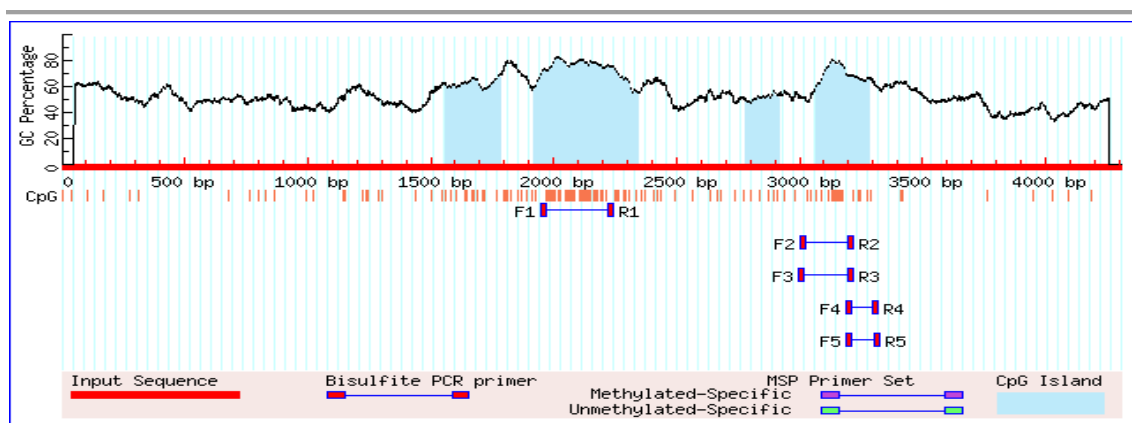
CpG plot 2000 up and down - MMP2 promoter region

AGCTCTCAGCTCTCCAACTTGGCTCTCTGGCTATCCACAGGACGTGGACATGAGCCCAGTGGGGCTGGGC
 CAGGAGGCAATCCCCCTTCCCAACTGACCTCAGTCTCGCCCTCTCCAAAACAGCCAAGGTTTGTCACTGG
 GTCAGGCTGAAGGGCTGGCTCCCTCCTGCGGGGCAAGGTCCCTCCCAAGAGGGTCTTTTAAAACTGACT
 CTGGAAGTCAAGAGCACACACCCACCAGACAAGCCTGAACCTGTCTGAAGCCCAGTGAAGCCCAAGCCGC
 AGAGACTTTTCTAGCTGTGATGATCAAGACATAATCGTGACCTCCAATGCCCCCACAAGTATATTGCTC
 CTGATTCTTTAGCCCCCTGACCTTACTTCTCAAACCTGTTCCCTGCTGACCCCCAGTCCCTATCTGCCCCCT
 TCCTAGGCTGGTCTTACTGACCCCTCCAGCTCCATCCCCCTACCCTGTGCCCCACCTTTTTTCAGATAGA
 AAAAACTTTCTTCCAGTGCCCTTGTGCTGTTTTTCATCTCTGGGCCATTGTCAA**TGTTCCCTAAAACAT**
TCCCCATATTCCCCACCCAGCACTCCACCTCTTTAGCTCTTCAGGTCTCAGCTCAGAAGTCACTTCTTCC
 AGGAAGCCTTCCCTTGATTGTCTTTACTAGTTTTAGGGGCTGAAGTCAGGCGTTCCCAACAGCCTGCTGGAG
 TTCCCCATCACAGCTTATCTCTCAACTGTCTTTCCCTGAGAGAGGG**AGAAGACATTCTCAGAGAC**GGTTG
 TCACAGGGAGAACTTCAAAAATTGGGATTGACCTGAGAGGCCACATGGATTCTTGGCTTGGCGCAGGAAA
 GGATTCAAGAGTGAGTGGGAATTCGTGGAACAGAGGGCTCCTCCCCTTTTTAGACCATATAGGGTAAAC
 CTCCCCACATTGCCATGGCATTATATAAACTGCCATGGCACTGGTGGGTGCTTCCTTTAACATGCTAATGC
 ATTATAATTAGCGTAAAAATGAGCAGTGAGGATGACCAGAGGTGCTTTCTTTGCCATCTTGGTTTTGGCT
 GGCTTCTTCACTGCATACTGTTTTATCAGTGGGGTCTTTGTGACCTCTATCTTATTAAACAGTCTTGCC
 CAATTTCTATCTCATCCTGTGACCGAGAATGCGGACCTCCTGGGAGTGCAGCCCAGCAGGTCTCAGCCT
 CATTTTACCCAGC**CCCCGTGTTCAAGATGGAGTC**GCTCTGGTTCCAACGTCTCTAACGCGGGGGCCCCCTGAC
 TGCTCTATTTCCCAAGGTGTATCTAGCATCTCGCACTATACGAGGCCAAGTTAAGGCTTACACATTTGCA
 GAAGGAAAG**AGGTAAGGAAGCAACCTGGG**ACCTTCCACTGTCTCTGTTTCCATCTCTCTCTTTCCATCTC
 TGTTTCATCCCAGAATCTCTCTGTCCCTATCCCTAAATATCGAAAATTTCTGTCTCTGACCATCTATCATT
 GTGGCTGATCATCTGTTTCTGACCATTCCTTCCCGTTCCCTGACCCAGGGAGTGCAGGGTGTCTTAGCCA
 AGCCGGCGTCCCTCCTAGTAGTACCGCTGCTCTCTAACCTCAGGACGTCAAGGGCCTAGAGCGACAGATG
 TTTCCCAGAGGGGGTCTGAGGCTGTGCGCCAGATCGCGAGAGAGGCAAGTGGGTGACGAGGTCTGTG
 CACTGAGGGTGGACGTAGAGGCCAGGAGTAGCAGGCGGCCGGGAAAAGAGGTGGAGAAAGAAAAAGA
 GGAGAA**AAGTGGAGGAGGGCGAGTAG**GGGGGTGGGGCAGAGAGGGGCGGGCCGAGTGCGCCCCCGCCC
 CCAGCCCCGCTCTGCCAGCTCCCTCCCAGCCAGCCGGCTACATCTGGCGGCTGCCCTCCCTTGTTTCCG
 CTGC**ATCCAGACTTCTCAGGCG**GTGGCTGGAGGCTG**CG**CATCTGGGGCTTTAAACATACAAAGGGATTG
 CCAGGACCTG**CGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGGGGCTGGGGCGCGGGGGCGGACCATGAGCGCTGAGCG**
GGGCAAAACCCAGGCCACCGAGCCAGCGGACCTCGGAGCGCAGCCCTGCGCGCGGAGCAGGCTCCAAC
CAGGCGGCGAGGCGGCCACCGCACCGAGCCAGCGACCCCGGGCGACCGCGGGGCCAGGGAGCGCTAC
GATGGAGGCGCTATGCGCCGGGCGCGCTCACGGGTCCCTGAGGGCGCTCTGTCTCTCTGGGCTGCCTG
CTGAGCCACCGCGCGCGCGCGCTCGCCCATCATCAAGTTCCCGGGCATGTGCCCCCAAAACGGACA
 AAGAGTTGGCAGTGGTGAGTTGCTGCGCTGGCCTCAAGGAACCACGTTTAGACAAACTTCGGAGGCAAG
 GATGGGGGTGTCTCTCCCCCTGCCCTCGGCGGTGGGCACACAGCGTGGGGGAGGGGCTTCGGTAAACAGC
 TTGGGGGGTCTTTGGCAAGCTATTGGAGTGATCTCTTGCAAACGGTGGGGGATCTTTTGTAAAGCAAAGAA
 AACCTTTGATAAAACAATTTGGCAACCTTCAGCATACAGCAGTGGGGCGAAAAACAAGCCAGAGAGTGGGA
 GAGGGGTGACCTGGCAAACTACTGGAAAGGACTCTTATGTAAATAGCGGGGACATCCTCTAGTATCTGG
 GACATTTGGCGGGGGGGGGGGGGCGGTCTTTGTAAACAACCTTTTGGACACATCTGGGCAGTTGCTAAGGGC
 TCTTGCCAAGCGTCTAGGTAAGCCTTTGGCAACAGCTACAGGGGTGCTTTTTTGCTAATGTAGGACTTTG
 GGAACGGTGTCTTGGCACACAATTTGGGTAACTTATGCGCGCATAAGGATGGGAGGGAGCTTGGTCAA
 GCGGGGCTTGGCAAAATTTCTAGGAACCTTCGGCACAGATCCGGAGAGGGACCTTTAAACAACACAGCTCGA
 GGGGGCAATTTGGGAAGTGATTGGGGCAGGAGGGAAGCAGAGAGCGCATCTTTTTTCTCTGGCTTAATG
 GACAAATTGGTCAAGGGCTGGGCCTCGGAAAGTTTCTTCGAACCTTCTCCAAAGGGTCGGAGAAAAGAAGG
 AGAGAGCTGGCCCGCAGGAGGGAGGAGGAGTGGGGCAGGCGCTGGAGGGCCCGGCGCGTGGGGCGGGGG
 CGGACTGCGCTCCGCTCGGGTCGGAGAGCGGCCAGAGAGCCCTCCTTCTTGGCTGGGCTCCCAACCGCG
 GTTCAGATGTTGTCTTGTGAGCGTGCGCGCGCTGGCTGGAGGGGCAGTGAAGCTGGCCGAGTGTGCG
 TAAGTAGGGCCTGAGGAGAGAGGACAGGCCAGGACCCATCAAGATGTCTTTCCAGTCCAGGGGATATCT
 GCTCCCTTGTTGCTTCAGCCACCCTGCCCTCCAGCCTCCCCCTCAACCTGTCCGGGAGAAGACGCCCATG
 CCTCTGGTCACCTAGGAACCTTCAGGAGGTGACAACTACCCTCTCCCAACTCTCACCTTCCAAAC
 AGCTAGGTCTCAGCCCCCTCTGGATAGATGGGTGGGAAACCTCCATACATTTTTTAGAGGGCTACTTTTT
 TCAAGGATCTGGAGCTGGCTGGCATAATGATGTGGCTGTTGGGTGGGGGTGAGAGTGGAGCTTTGGGACA
 ATGACAAAGCTACTTGGTTTTCTACACCTTTTCCAGCCAATGGGTACAGGATGAACCCCTAAATTGGGG
 TTCAGCCTGGGGGCCACATGGGTTCTTGGCTTGACAGGAAGGAATTCAAGAGCGAGCCAACAGAGTAAA
 GTGAAAACAAATTTATTAAGAAGGTAAAGGAATAAAAGGGTGATTATTCATAGACAGAGCAGGGAATGG
 GCTGCTGGACTGAGTATACATATGGTTATTTCTTGATTATATGCTAAACAAGGGGTGGATTATTTAAGAG
 TTTTCCAGAAAAAGGGTGGGGAGTTCTTGGAAACCGAGGGTTTCTCTCCCTTTTAGACCATATAGGGTAAC
 TTCTCAATGTTGCTATGGCATTATATAAACTGTACAGCGCTGGTGGGAGTGTCTAATGTATTTAAC**ATGC**

TAATACATTATAATTAGCATATAATGAGCAGTGAGGACGACTAGAGGGTCACTTTTCATTGCAGTCTTGGTT
TGGGTGGGCTTTCTCCAGCTTCTTTACTGCATCCTGTTTTATCATAGGGGTCTTTGTGACCCGAAGTGT
TATGGTGAAATCAGTCCTACCAACCTCCTGTCTCATTCTGTGACTAAGAATGCATGCCTGCCCTCCTGGG
AATGAAGCACAGCAGGTCTCAGCCTCATCTTACCCA

OBS: Em azul estão localizados os iniciadores de qPCR para o transcrito *MMP2*. Em amarelo em verde os iniciadores B1 e B2 do qPCR da ChIP. Em rosa estão marcados os dinucleotídeos CpG da ilha de CpG 2 avaliada neste estudo. O ATG está assinalado em vermelho na sequência.

SEQUENCIA



Sequence Name: *MMP2* promoter region
Sequence Length: 4306

CpG island prediction results

(Criteria used: Island size > 100, GC Percent > 50.0, Obs/Exp > 0.6)

4 CpG island(s) were found in your sequence

	Size	(Start - End)
Island 1	221 bp	(1560 - 1780)
Island 2	424 bp	(1921 - 2344)
Island 3	135 bp	(2780 - 2914)
Island 4	222 bp	(3065 - 3286)

```

1  AGCTCTCAGCTCTCCAACCTTGGCTCTCTGGCTATCCACAGGACGTGGACATGAGCCCACT
   ||::||::||::||::||::||::||::||::||::||::||::||::||::||::||::||
1  AGTTTTTAGTTTTTTAATTTGGTTTTTTGGTTATTTATAGGACGTGGATATGAGTTTAGT

61  GGGGCTGGGCCAGGAGGCAATCCCCCTTCCCAACTGACCTCAGTCTCGCCCTCTCCAAA
   ||||::||||::||||::||||::||::||::||::||::||::||::||::||::||::||
61  GGGGTTGGGTTAGGAGGTAATTTTTTTTTTTTAATTGATTTTAGTTTCGTTTTTTTTTAAA

121  CAGCCAAGGTTTGTCACTGGGTCAGGCTGAAGGGCCTGGCTCCCTCCTGCGGGGCAAGGT
   ::||::||||||::||::||||::||::||::||::||::||::||::||::||::||::||
121  TAGTTAAGGTTTGTATTGGGTTAGGTTGAAGGGTTGGTTTTTTTTTTGCGGGGTAAGGT

181  CCCTCCAAGAGGGTCCTTTAAAACTGACTCTGGAAAGTCAGAGCACACACCCACCAGAC
   ::::||::||::||::||::||::||::||::||::||::||::||::||::||::||::||
181  TTTTTTTAAGAGGGTTTTTTTAAAAATTGATTTTGGAAAGTTAGAGTATATATTTATTAGAT

241  AAGCCTGAACTTGTCTGAAGCCCACTGAGACCCAAGCCGCAGAGACTTTTCTAGCTGTGA

```


B1-F
1201 AGC**CCCCCTGTTCAAGATCGAGTC**GGCTCTGGTTCCAACGTCTCTAACGCGGGGGCCCCTGAC
| | : : : : | | | : | | | | | | | | ++ : : | | | | : : | | ++ : : | | | | ++++ | | : : : : | | :
1201 AGTTTTTTTGTTTAAGATGGAGTCGTTTTGGTTTTTAACGTTTTTAACGCGGGGTTTTTGAT

1261 TGCTCTATTTCCCAAGGTGTATCTAGCATCTCGCACTATACGAGGCCAAGTTAAGGCTTA
| | : : | | | | : : | | | | | | : | | : | | : ++ : : | | | | ++ | | : : | | | | | | : | |
1261 TGTTTTATTTTTTAAGGTGTATTTAGTATTTTCGTATTATACGAGGTTAAGTTAAGGTTTA

B1- R

```
1321 CACATTTGCAGAAGGAAAGAGCTAAGCAAGCAACCTGGGACCTTCCACTGTCTCTGTTTC  
      |:|:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:|||||:  
1321 TATATTTGTAGAAGGAAAAGAGGTAAGGAAGTAATTTGGGATTTTTTATTGTTTTTGTTT  
  
1381 CATCTCTCTCTTTCCATCTCTGTTTCATCCCAGAATCTCTCTGTCCCTATCCCTAAATATC  
      :||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|+  
1381 TATTTTTTTTTTTTTTTTATTTTTGTTTATTTTAGAATTTTTTTGTTTTATTTTAAATATC  
  
1441 GAAAATTTCTGTCTCTGACCATCTATCATTTGTGGCTGATCATCTGTTTCTGACCATTCCCT  
      +|||||||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:  
1441 GAAAATTTTGTTTTTGATTATTTATTATTGTGGTTGATTATTTGTTTTGATTATTTT  
  
1501 TCCCGTTCCTGACCCCAGGGAGTGCAGGGTGTCTTAGCCAAGCCGGCGTCCCTCCTAGTA  
      |::++||:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:|:  
1501 TTTCGTTTTTGATTTTAGGGAGTGTAGGGTGTTTTAGTTAAGTCGGCGTTTTTTTTTAGTA
```

F - Chik & Scvf, 2010

Ilha 1

1561 GTACGCTGCTCTCTAACCTCAGGAATCAAGGGCCTAGAGGCACAGATGTTTCCCAGCA
|||:++:||:||||:|||||++:|||||:|||||++:|||||:|:|:
1561 GTATCGTTGTTTTTAATTTTAGGACCTTAAGGGTTTAGAGCATAGATGTTTTTTAGTA

1621 GGGGGTTCTGAGGCTGTGCCCCAGATGGCAGAGAGGCAAGTGGGGTGACAGGTCTGTG
|||||:|||||:|||||++::|||++++|||:|||||++|||++||
1621 GGGGGTTTTGAGGTTGTGCTTTTAGATGGCAGAGAGGTAAGTGGGGTGACAGGTCTGTG

1681 CACTGAGGGTGGACCTAGAGGCCAGGAGTAGCAGGCGCGCGGGGAAAAGAGGTGGAGAAA
:|:|||||++|||:|||||:|||||++:++||| |||||
1681 TATTGAGGGTGGACCTAGAGGTTAGGAGTAGTAGGCGGTGGGGAAAAGAGGTGGAGAAA

[illegible]

B2-R

1861 ACATCTGGCGGCTGCCCTCCCTTGTTCGCTGC**AATCCAGACTTCTCAGGCG**GTTGGCTG
|::|||++:||:::||::|||||:++:||::|||:|::|||++|||::|
1861 ATATTGGCGGTTGTTTTTTTTTGTTTCGTTGTATTTAGATTTTTTTTAGCGCGTGGTTG

Ilha 2

11ha 2 1 2 3 4
1921 GAGGCTGCGCATCTGGGGCTTTTAAACATACAAAGGGATTGCCAGGACCTGCGGCGGCGG
| | | | : | ++ : | : | | | | : | | | | : | | : | | | | : | : | | : | ++ ++ ++ +
1921 GAGGTTGCGTATTTGGGGTTTTTAAATATATAAAGGGATTGTTAGGATTTGCGGCGGCGG

R - Chik & Zcyf, 2010 **F** - Ramos et al., 2013

F - Chernov, 2009

1981 GGCGCGCGGGGGCTGGGGCGCGGGGGCGGACCATGAGCGCTGAGCGGGCAAACCC
 + ++ ++ ++ ||| : ||| | ++ | ||| : ++ | : ||| : ++ | ||| : ++ | : ||| : :
 1981 GGCGCGCGCGGGGTTGGGGCGCGGGGGTGGATTATGAGTGGTTGAGTGGGGTAAATTT

[illegible]

CpG Plot sequence *MMP2*

AGC **CCCCTGTTCAAGATGGAGTC** GCTCTGGTTCCAACGTCTCTAACGCGG **B1F**
 GGCCCCTGACTGCTCTATTTCCCAAGGTGTATCTAGCATCTCGCACTATA
 CGAGGCCAAGTTAAGGCTTACACATTTGCAGAAGGAAAG **AGGTAAGGAAG** **B1R**
CAACCTGGG ACCTTCCACTGTCTCTGTTTCCATCTCTCTCTTTCCATCTC
 TGTTTCATCCCAGAATCTCTCTGTCCCTATCCCTAAATATCGAAAATTTCT
 GTCTCTGACCATCTATCATTGTGGCTGATCATCTGTTTCTGACCATTCCCT
 TCCCGTTTCTGACCCCAAGGAGTGACAGGGTGCTCTAGCCAAGCCGGCGTC
 CCTCTAGTAGTACCGCTGCTCTCTA **ACCTCAGGACGTCAA** GGGCCTAGA FT - NRSF
 GCGACAGATGTTTCCAGCAGGGGGTCTGAGGCTGTGCGCCAGATCGC
 GAGAGAGGCAAGTGGGGTGACGAGGTCGTGCACTGAGGGTGACGTAGAG
 GCCAGGAGTAGCAGGCGCGCCGGGAAAAGAGGTGGAGAAAAGGAAAAAGA **B2F**
 GGAGAA **AAGTGGAGGAGGCGAGTAG** GGGGCTGGGGCAGAGAGGGGCGGG FT - ~~SP1GC BOX~~
 CCCGAGTGCGCCCCCGCCCCAGCCCCGCTCTGCCAGCTCCCTCCAGC
 CCAGCCGGCTACATCTGGCGGCTGCCCTCCCTTGTTTCCGCTGC **ATCCAG** **B2R**
ACTTCTCAGGCG GTGGCTGGAGGCTGCGCATCTGGGGCTTTAAACATAC
 AAAGGGATTGCCAGGACCTG **CG** GCGG **CGGCGGCGGCGGCGGGGGCTGGGG** FT - **CTCF** - CG n°1
CGG GGGGGCCGACCATGAGCCGCTGAGCCGGGCAAACCCAGGCCACCG ~~GC BOX~~
 AGCCAGCGGACCCTCGGAGCGCAGCCCTGCGCGCGGAGCAGGCTCCAAC FT - **CTCF**
 CAGGCGGCGAGGCGGCCACACGCACCGAGCCAGCGACCCCGGGCGACGC
 GCGGGGCCAGGGAGCGCTACGATG **GAGCCGCTAATGCCCCGGGGCGCGCT** FT - **PRDM** 33 ao 37 **+1**
GACG GGTCCCCTGAGGGCGCTCTGTCTCTGGGCTGCCCTGCTGAGCCACG
 CCGCCGCGCGCGCTCGCCATCATCAAGTTCCCGGCGAT **TGTCGCCCCG** FT - **C2H2**
AAAA **CGGACAAAG** AGTTGGCAGTGGTGAGTTGCTGCGCTGGCCTCAAGGA **CG** - n°49
 ACCACGTTTAGACAAACTTCGAGGCAAAGGATGGGGGTGTCTCTCCCC
 TGCCCTCGGCGGTGGGCACACAGCGTGGGGGAGGGGCTTCGGTAAACAGC
 TTGGGGGGTCTTTGGCAAAGCTATTGGAGTGATCTCTTGCAAACGGTGGGG
 GATCTTTTGTAAACAAAGAAAACCTTTGATAAACAATTTGGCAACCTTCA
 GCATACAGCAGTGGGG **GCGAAAAACAAGCCAGAGAG** TGGGAGAGGGGTGAC
 CTGGCAAATACTGGAAAAGGACTCTTATGTAAATAGCGGGGACATCCTC
 TAGTATCTGGGACATTTGGCGGGGGGGGGGGCGGTCTTTGTAAACA **ACT**
TTTGGACACATCTGGGC AGTTGCTAAGGGCTCTTGCCAAGCGTCTAGGTA
 AGCCTTTGGCAAACAGCTACAGGGGTCGTTTTTGCTAATGTAGGACTTTG

Região promotora de *MMP2* após análise no CpG Plot. Em amarelo estão localizados os iniciadores para a reação de ChIP (B1). Em verde estão localizados os iniciadores para a reação de ChIP (B2). Os dinucleotídeos presentes na ilha estão grifados. Alguns fatores de transcrição dado pelo software *TF search* estão mostrados na sequência (azul, cinza e rosa). Em rosa está destacado a localização do sítio PRDM em cima dos CpGs 33 ao 37. A localização do +1 ATG também é mostrado na sequência.

Tabela 1: Sequência dos iniciadores utilizados para as reações de PCR e qPCR.

Gene	Universal (5' – 3')	Reverso (5' – 3')	Condições de Amplificação	Tamanho (pb)
RT-PCR				
<i>RT_MMP2</i>	TACACCTACACCAAGAACTTC	GTCCTTGAAGAAGATCTC	94°C – 30" / 50°C – 30" / 72°C – 30"	194
<i>GAPDH</i>	CTGCACCACCAACTGCTTA	CATGACGGCAGGTCAGGTC	94°C – 30" / 62°C – 45" / 72°C – 45"	296
Amplificação das Ilhas				
<i>BIS_MMP2</i>	AAGGGATTGTTAGGATTTG	CAACAACTCACCCTAC	51°C / 53°C / 55°C, 52°C / 54°C / 56°C	365
<i>BIS_SATR-1</i>	GTTATATTATTTTTGTTTTTTTG TATAGTGGTGGTGTATATTTG	ACATTTTCCTTATAATATTATTCC CACCTAACCTATAATATTTCTTC	48°C / 50°C / 52°C 50°C / 52°C / 54°C	- 690
PCR em Tempo Real				
<i>qGAPDH</i>	ACCCACTCCTCCACCTTTGA	CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT	95°C – 15" / 60°C – 1' 40X	101
<i>qHPRT</i>	GAACGTCCTTGCTCGAGATGTGA	TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT	95°C – 15" / 60°C – 1' 40X	101
<i>qHMBS</i>	TGGACCTGGTTGTTCACTCCTT	CAACAGCATCATGAGGGTTTTTC	95°C – 15" / 60°C – 1' 40X	102
<i>qMMP2</i>	AGCTCCCGGAAAAGATTGATG	CAGGGTGCTGGCTGAGTAGAT	95°C – 15" / 60°C – 1' 40X	101
MSP				
<i>MMP2</i> (M)	GCGGTTATAC <u>CGTATCG</u> AGTTAGC	ACTCTTTATCCGTTTTTAAAAACGAC	94°C – 45" / 51.2°C – 20" / 72°C – 45"	205
<i>MMP2</i> (U)	GGTGGTTATATGTAT <u>TGAGTTAGTGA</u>	ACTCTTTATCCATTTTTTAAAAACAAC	94°C – 45" / 45.3°C – 20" / 72°C – 45"	206
<i>ESR1</i> (M)	ACGAGTTTAAACGTCGCGGTC	ACCCCCCAAACCGTTAA AAC	94°C – 45" / 57.6°C – 30" / 72°C – 45"	140
<i>PGR</i> (M)	TGATTGTCGTTTCGTAGTACG	CGACAATTTAATAACACGCG	94°C – 45" / 54°C – 30" / 72°C – 45"	200
ChIP <i>MMP2</i>				
B1	CCCCTGTTCAAGATGGAGTC	AGGTAAGGAAGCAACCTGGG	95°C 15" / 60°C 1'30	156
B2	AAGTGGAGGAGGGCGAGTAG	ATCCAGACTTCCTCAGGCG	95°C 15" / 60°C 1'30	157

